

STEUERUNG DER MORPHOGENESE IN KALLUSKULTUREN
UND EMBRYOBILDUNG AUS EINZELZELLEN
VON DAUCUS CAROTA.

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

zur

Erlangung der Doktorwürde

vorgelegt

dem Fachbereich Biologie
der Freien Universität Berlin

von

Dietlinde Hüse^umann, geb. Backs
aus Berlin

1971

STEUERUNG DER MORPHOGENESE IN KALLUSKULTUREN
UND EMBRYOBILDUNG AUS EINZELZELLEN
VON DAUCUS CAROTA.

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

zur

Erlangung der Doktorwürde

vorgelegt

dem Fachbereich Biologie
der Freien Universität Berlin

von

Dietlinde Hüsemann, geb. Backs

aus Berlin



1. Referent: Prof. Dr. J. Reinert
2. Referent: Prof. Dr. Th. Eckardt

Tag der mündlichen Prüfung: 3.11.1971

Tag der Promotion:

INHALT

<u>EINLEITUNG</u>	4
 <u>MATERIAL UND METHODE</u>	
Kallusanzucht und -subkultur	7
Kultur und Beobachtung von Einzelzellen	7
Nährmedien	10
Definitionen und Abkürzungen	10
 <u>ERGEBNISSE</u>	
I. Untersuchungen zur Totipotenz von Kalluskulturen	
1. Morphogenese in Abhängigkeit vom Medium und von der Dauer der Kulturzeit in vitro	14
2. Kontrolle der Embryo- und Wurzelbildung in älteren Kulturen	17
3. Unterschiedliche Reaktion verschiedener Stammkulturen	25
 II. Versuche mit Einzelzellen auf Agarplatten	
1. Teilungswachstum isolierter Einzelzellen auf synthetischem Medium	28
2. Embryobildung aus isolierten Zellen	33
 <u>DISKUSSION</u>	
	40
 <u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	
	57
 <u>LITERATUR</u>	
	59



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548807_0057

EINLEITUNG

Zellkulturen aus *Daucus carota* sind für morphogenetische Untersuchungen besonders geeignet, weil sie eine ausgeprägte Fähigkeit zur Formbildung besitzen. Embryogenese und Rhizogenese können durch chemisch eindeutig definierte Nährmedien ausgelöst werden (REINERT 1959; HALPERIN und WETHERELL 1964; REINERT, BACKS und KROSING 1966; REINERT 1967 a). Darüberhinaus sind verschiedene Faktoren bekannt, die besonders jüngere Kulturen zur Bildung von Embryonen veranlassen (REINERT et al. 1966; HALPERIN 1966; REINERT, TAZAWA und SEMENOFF 1967; REINERT und TAZAWA 1969).

Kalluskulturen aus Karotten und aus zahlreichen anderen Pflanzen verlieren jedoch trotz regelmäßiger Übertragung auf frische Nährmedien einige Zeit nach der Isolierung der Explantate die Fähigkeit Organe zu bilden (vgl. SYONO 1964 a; GAUTHERET 1966; REINERT 1968). Die Ursache für dieses Verhalten ist noch ungeklärt. Es war bisher auch nicht möglich, die Instabilität der Zellen zu beeinflussen oder zu kontrollieren. Nach eingehender Untersuchung über die Dauer der Regenerationsfähigkeit ist es in der vorliegenden Arbeit gelungen, durch verschiedene Substratveränderungen die Organbildung zu steuern und in älteren Kulturen erneut zu induzieren.

Ein weiteres Problem betrifft den Verlauf der Embryogenese in vitro. Obwohl Embryonen jetzt in den verschiedensten pflanzlichen Gewebekulturen induziert werden können (vgl. REINERT 1968), ist die Ontogenese dieser Embryonen noch in keinem Fall direkt beobachtet worden (KATO 1968). Ihre Entwicklungsgeschichte ist bisher nur aus verschiedenen, nebeneinander vorkommenden Stadien rekonstruiert worden (REINERT 1959; STEWARD 1963; KATO und TAKEUCHI 1963; HALPERIN und WETHERELL 1964; VASIL und HILDEBRANDT 1966). Dabei ist angenommen worden, daß bestimmte Zellen innerhalb eines Kallus bzw. in der Zell-

suspension sich ähnlich wie Zygoten verhalten und durch regelmäßige Teilungen zu ganzen Pflänzchen heranwachsen.

Die Embryobildung freischwimmender Zellen in einem flüssigen Medium, das Kokosnußmilch enthielt, veranlaßte STEWARD und seine Gruppe (1963, 1966), ihre Versuchsbedingungen als notwendige Voraussetzung für die Embryogenese in vitro anzusehen. Nach dieser Hypothese müßten die Kalluszellen, ähnlich den Eizellen bei der normalen Entwicklung, physiologisch isoliert als Einzelzellen vorliegen und außerdem dem äußeren Stimulus eines flüssigen Endosperms - z.B. der Kokosnußmilch - ausgesetzt sein, damit sie zu Embryonen werden. Der Zusatz komplexer Komponenten, wie der KOM, hat sich durch den Gebrauch von geeigneten vollsynthetischen Nährlösungen erübrigt. Bestehen bleibt das Problem der Fähigkeit isolierter Einzelzellen zur Embryogenese und der Entwicklungsgeschichte der Embryonen (GAUTHERET 1966; HALPERIN 1966 a; REINERT 1967 a), da die bisher verwendeten Methoden eine direkte Beweisführung ausschließen. Nach allen bisherigen Ergebnissen entstehen Embryonen in Kulturen aus Karotten und aus anderen Pflanzen nur aus vielzelligen Explantaten oder Zellgruppen (vgl. KONAR und NATARAJA 1965; HALPERIN und JENSEN 1967; HOMES und GUILLAUME 1967; KATO 1968).

Die ideale experimentelle Lösung der Frage der Ontogenese der Adventivembryonen durch direkte Beobachtung ist der Weg über die Kultur von isolierten Einzelzellen bis zum Embryo; dabei interessieren vor allem die ersten Entwicklungsschritte. Verschiedene Versuche mit isolierten Einzelzellen in Mikrokultur brachten bisher keine Klärung. Durch irregulär aufeinanderfolgende Teilungen mit anschließender Streckung entstand in mehreren Fällen nur parenchymatischer Kallus (BLAKELY 1964; BALL und JOSHI 1965). Es ist auch gelungen an solchen Kalluskulturen (single cell clones), die sich aus Einzelzellen

entwickelten, durch Veränderung des Nährmediums ganze Pflänzchen zu induzieren (EARLE und TORREY 1965b; VASIL und HILDEBRANDT 1965; LUTZ 1966), deren Entwicklungsgang blieb auch in diesen Fällen ungeklärt, d.h. es gibt bisher keine direkten fortlaufenden Beobachtungen über die Entstehung von Embryonen aus einer isolierten Einzelzelle. Das ist aber in der folgenden Untersuchung mit Einzelzellen aus Karottenkallus erreicht worden. Voraussetzung dazu war ein vollsynthetisches Medium, das einerseits die Teilung von isolierten Zellen ermöglicht (BACKS 1967), andererseits auch zur Induktion von Embryonen geeignet ist (REINERT, BACKS und KROSING 1966).

Innerhalb bestimmter Grenzen kann das Verhältnis der Beimpfungsmenge der Zellen zum Volumen des Nährbodens entscheidend sein für die Teilungsbereitschaft der Einzelzellen. Das ist zuerst für Tumorzellen aus Crown gall Kulturen von *Vitis vinifera* nachgewiesen worden (REINERT und v.ARDENNE 1964). Die folgenden quantitativen Untersuchungen zeigen, daß zum Teilungswachstum von isolierten Einzelzellen aus "normalem" Kallus ebenfalls zusätzlich thermostabile Faktoren erforderlich sind, die von den wachsenden Daucus-Kalluskulturen in das synthetische Nährmedium abgegeben werden.

MATERIAL UND METHODE

Kallusanzucht und -subkultur.

Die Kalluskulturen stammten von Explantaten aus dem oberen Drittel der Hauptwurzeln von Daucus carota L. Varietäten "Lobbericher Futterrübe" (LF) und "Rote Riesen" (RR) der Fa. Sperling (Bevensen), die entweder frisch geerntet oder bis zu 6 Monate bei $4 \pm 1^{\circ} \text{C}$ gelagert waren. Die Oberflächensterilisierung der geschälten Rüben erfolgte in 9%iger Chlorkalklösung. Querschnitte der Kantenlängen $0,4 \times 0,4 \times 0,1 \text{ cm}$, die außer dem Kambium Teile des Xylems und der sekundären Rinde enthielten, wurden unter sterilen Bedingungen (GAUTHERET 1959) auf 10ml 0,8%igem Schrägagar in Glasröhrchen ($\varnothing 2,2 \text{ cm}$; Länge 15 cm) isoliert und im Dauerdunkel bei $28 \pm 1^{\circ} \text{C}$ kultiviert.

Um möglichst zuverlässige Ergebnisse zu erzielen, und Schwankungen in der Reaktion des Testmaterials auszugleichen, war es erforderlich für jede Versuchsreihe 20 bis 30 Kulturen aus mindestens 3 bis 5 verschiedenen Mutterpflanzen zu isolieren. Der Prozentsatz embryonenbildender Kulturen wurde am Ende jeder vierwöchigen Übertragungsperiode bestimmt. Bewertet wurden nur solche Kulturen, die mit bloßem Auge oder mikroskopisch eindeutig erkennbare herzförmige bzw. ältere Stadien von Embryonen enthielten (Abb. 15 B bis D). Wurzeln wurden gesondert registriert, wenn sie ohne Verbindung mit den Embryonen als monopolare, blind im Kallus endende Organe auftraten. Zur Subkultur wurden nur organfreie Kallusstückchen benutzt.

Kultur und Beobachtung von Einzelzellen.

Als Ausgangsmaterial für Versuche mit Einzelzellen eigneten sich gutwachsende, lockere Stammkulturen der Lobbericher Futterrübe. Zur Gewinnung der Zellen aus dem Kallus wurden Gewebestückchen vom Außenrand der Kulturen auf der Oberfläche einer 3 mm dicken Agarschicht in Petrischalen ($\varnothing 7,5 \text{ cm}$) mit einem feinen Spatel umhergewälzt (Plattentechnik nach BERGMANN 1960, modifiziert von REINERT und v.ARDENNE 1964). Durch dieses Verfahren lösten sich vom Kallus neben vielzelligen Gruppen auch zahlreiche Einzelzellen, die isoliert d.h. ohne

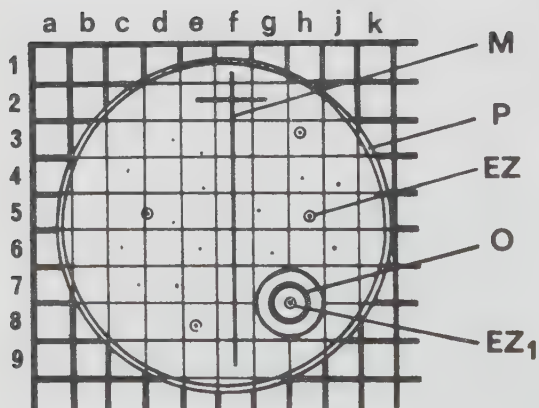


Abb. 1 Markierungssystem für Einzelzellen
in Aufsicht auf den Mikroskoptisch.

Auf der Unterseite der Versuchsplatte (P) sind Markierungskreuz (M) und Umkreisungen der Einzelzellen (EZ) angebracht. Einzelzellen sind hier als Punkte eingezeichnet. In der Abbildung liegt z.B. die eingekreiste Zelle (EZ₁) direkt über dem Objektiv (O) des umgekehrten Mikroskops, wenn das Markierungskreuz (M) auf die Koordinate (2; f $\square$) eingestellt wird.

Kontakt mit Nachbarzellen auf dem Agar liegen blieben. Die verwendeten Gewebestückchen wurden nur soweit verrollt, bis die Agarfläche gleichmäßig, aber lückenhaft mit Zellen bedeckt war. Die Reststückchen wurden in gleichen Abständen voneinander zusätzlich auf der Agarplatte angeordnet.

Bei Verwendung kleiner Beimpfungsmengen ($\leq 50\text{mg}$) wurde der Kallus vor dem Verstreichen direkt auf der Agarplatte in einem Tropfen ($0,2\text{ ml}$) flüssiger Nährlösung aufgeschwemmt. Nach der Verteilung schwammen die Zellen zunächst noch umher, die Flüssigkeit zog aber bis zum nächsten Tag vollständig in den Agar ein.

Enthielt der Kallus Regenerationen, so war es zweckmäßiger die Zellen vor dem Ausstreichen auf Agarplatten eine zeitlang als Suspension zu schütteln. Dazu wurden ca. 50 mg Gewebe, das leicht dissoziierte, in 20 ml Nährlösung suspendiert und in Erlenmeyerkolben (100 ml) auf einem Horizontalschüttler bei 50 U/min. zwei bis vier Wochen lang kultiviert. Danach wurde die Suspension durch Monodur-Gaze (Maschenweite $100\text{ }\mu$) filtriert, um Embryorègenerate und größere Zellkolonien abzutrennen. Aus dem Filtrat wurden dann Einzelzellen und wenigzellige Gruppen abzentrifugiert (4000 U/min.) und anschließend auf den Agarplatten ausgestrichen.

Für die quantitativen Versuche wurde das Beimpfungsgewebe in sterilen Aluminiumkästchen ausgewogen (Genauigkeit: $\pm 1\text{mg}$). Zum Schutz gegen Austrocknung wurden die Platten mit Tesa-Film verschlossen. Die Versuchsplatten kamen wie die Stammkulturen bei 28° C ins Dunkel.

Zur direkten Beobachtung der Zellen wurde ein umgekehrtes Mikroskop der Fa. Leitz benutzt. Mittels eines Koordinatensystems auf dem Mikroskoptisch und zusätzlicher Umkreisungen auf der Plattenunterseite ließen sich die Zellen jederzeit leicht wiederauffinden. Zur Feststellung von Zellteilungen wurden am 2. und 3. Versuchstag je 15 intakte Einzelzellen aufgezeichnet und die Koordinaten des dazugehörigen Fixierungspunktes notiert (Abb. 1). Für Zellen, die zwischen dem 2. und 3. Versuchstag abstarben - möglicherweise als Folge mecha-

nischer Beschädigung bei der Isolierung - wurden zum Ersatz andere Zellen notiert, so daß am 3. Tag von jeder Platte mindestens 30 intakte Einzelzellen zur Beobachtung vorlagen. Diese Zahl diente als Grundlage zur Berechnung der Zellteilungsrate (plating efficiency). Die statistische Auswertung der Versuchsergebnisse erfolgte nach dem t-Test (PÄTAU 1943).

Nährmedien.

Die Kulturen wurden auf den beiden synthetischen Grundmedien "M_W" und "M_S" angelegt (REINERT, BACKS und KROSING 1966). "M_W" enthielt die Makro- und Mikroelemente nach der Formel von WHITE (1954) (Tab. 1a), "M_S" dagegen die Salze nach MURASHIGE und SKOOG (1962) (Tab. 1b). Organische Zusätze für beide Medien waren 2% Saccharose, 5×10^{-8} g/ml 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (2,4-D), 0,8% Difco-Agar und in der Regel die organischen Verbindungen (Plant organics) nach WHITE (1954) (Tab. 2a und b). Für einige Einzelzellversuche ist "M_S" statt mit "plant organics" mit den organischen Zusätzen nach MURASHIGE und SKOOG benutzt worden und wird in diesem Fall als "M_{S1}" bezeichnet (Tab. 2c).

Die Nährlösungen wurden mit 0,1n NaOH auf einen pH-Wert von 5,8 eingestellt und nach Zugabe des aufgeschmolzenen Agars 20' lang bei 1 atü. im Autoclaven sterilisiert.

Definitionen und Abkürzungen.

E x p l a n t a t e sind Gewebestückchen, die zur Kallusbildung der Pflanze entnommen werden.

Ein G e w e b e s t a m m oder eine S t a m m k u l t u r umfaßt alle Kulturen, die aus derselben Mutterpflanze stammen und seit der Isolierung unter gleichbleibenden Kulturbedingungen wachsen.

Beim Ansatz einer V e r s u c h s r e i h e werden Kulturen aus parallel gezüchteten Gewebestämmen unter veränderte Versuchsbedingungen gebracht.

Eine V e r s u c h s s e r i e umfaßt wiederholte Versuchsreihen mit fortschreitendem Alter der Stammkulturen.

(RR) Rote Riesen, (LF) Lobbericher Futterrübe.

Tab. 1

a) Mineralsalze nach WHITE (1954) in "M_W"

Makroelemente			Mikroelemente		
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	288	mg/l	H ₃ BO ₃	1,5	mg/l
KNO ₃	80	"	MnSO ₄ ·4H ₂ O	6,6	"
KCl	65	"	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	2,7	"
Na ₂ SO ₄	200	"	KJ	0,75	"
MgSO ₄ ·7H ₂ O	737,5				
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	19	"			
Fe ₂ (SO ₄) ₃	2,6	"			

b) Mineralsalze nach MURASHIGE und SKOGG (1962) in "M_S"

Makroelemente			Mikroelemente		
NH ₄ NO ₃	1650	mg/l	H ₃ BO ₃	6,2	mg/l
KNO ₃	1900	"	MnSO ₄ ·4H ₂ O	22,3	"
CaCl ₂ ·2H ₂ O	440	"	ZnSO ₄ ·4H ₂ O	8,6	"
MgSO ₄ ·7H ₂ O	370	"	KJ	0,83	"
KH ₂ PO ₄	170	"	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,25	"
Na ₂ -EDTA	37,3	"	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,025	"
FeSO ₄ ·7H ₂ O	27,8	"	CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,025	"

Tab. 2

a)	Saccharose	20	g/l
	2,4-Dichlorphen- oxyessigsäure (2,4-D)	5×10^{-8}	g/ml
	Difco-Agar	8	g/l
b)	"plant organics" nach WHITE (1954)		
	Glycin	3	mg/l
	Nikotinsäure	0,5	"
	Pyridoxin.HCl	0,1	"
	Thiamin.HCl	0,1	"
c)	organische Verbindungen nach MURASHIGE und SKOOG (1962)		
	Myo-Inositol	100	mg/l
	Glycin	2	"
	Nikotinsäure	0,5	"
	Pyridoxin.HCl	0,5	"
	Thiamin.HCl	0,1	"

Die Angaben in g/ml bzw. g/l bezeichnen die Endkonzentrationen der Substanzen in der fertigen Nährlösung.

Embryonen bildende Kulturen in %

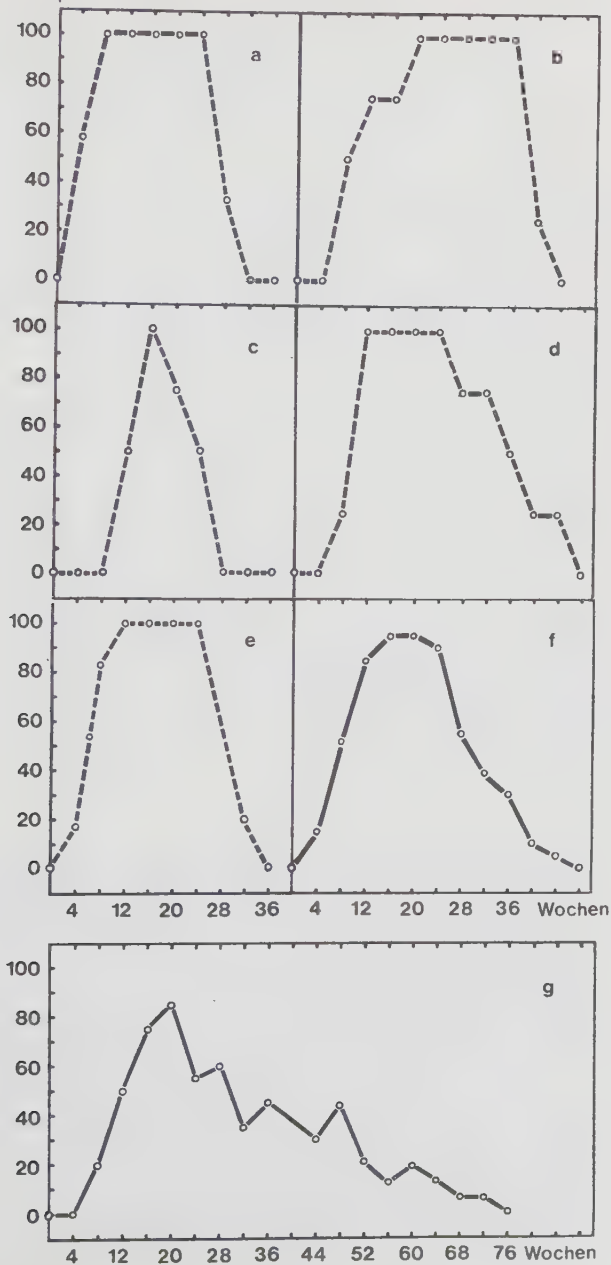


Abb. 2

ERGEBNISSE

I/1 Morphogenese in Abhängigkeit vom Medium und von der Dauer der Kulturzeit in vitro.

Zur Kallusbildung an frisch isolierten Explantaten sowie zur Induktion von Adventivembryonen in jungen Kulturen aus Karotten eignet sich am besten das vollsynthetische M_S -Medium (REINERT, BACKS und KROSING 1966; REINERT 1967a). Auf " M_S " folgt die Embryobildung einem charakteristischen zeitlichen Verlauf, wie ihn z.B. eine Versuchsreihe mit Kulturen aus 5 verschiedenen "Lobbericher Futterrüben" (LF) zeigt. (Abb. 2). Vier bis acht Wochen nach der Isolierung traten an einzelnen Kulturen die ersten Embryonen auf. Im Zeitraum zwischen 8 und 36 Wochen bildeten bestimmte Stammkulturen (a - e) 100%ig Embryonen. Nach Erreichen des Maximums - im Mittel 95% nach 16 bis 20 Wochen - nahm die Embryobildung deutlich ab, um nach 44-wöchiger Kulturzeit zu erlöschen (Abb. 2f). In seltenen Fällen blieb die Fähigkeit zur Embryogenese auf " M_S " länger erhalten (Abb. 2g), z.B. bei 4 Stämmen der "Roten Riesen" (RR) bis zu 72 Wochen nach der Isolierung der Kulturen.

Abb. 2 Verlauf der Embryobildung an frisch isolierten Kulturen aus Karotten auf " M_S ".

a - f: Normalverlauf bei 5 Stämmen der LF mit je 4 bis 12 Kulturen.

g: Abweichender Verlauf bei 4 Stämmen der RR mit unregelmäßiger und länger dauernder Embryobildung.

o---o: Einzelkurven; o—o: Summenkurven.

Ordinaten: Embryonen bildende Kulturen in %.

Abszissen: Zeit in Wochen nach der Isolierung der Kulturen.



Unter Berücksichtigung der Reaktionen von 25 verschiedenen Gewebestämmen der RR und LF ergibt sich für die mittlere Dauer der embryonenbildenden Phase auf "M_S" eine Zeit von 30 ± 8 Wochen, deren durchschnittlicher Beginn 8 ± 2 Wochen nach der Isolierung der Kulturen zu setzen ist (Tab. 3).

Gewebe- stamm Nr.	Embryobildung auf "M _S "		
	Beginn nach Wochen	Ende nach Wochen	Dauer in Wochen
1	8	40	32
2	12	24	12
3	4	28	24
4	4	32	28
5	8	44	40
6	4	36	32
7	8	40	32
8	4	44	40
9	4	56	52
10	4	48	44
11	8	48	40
12	8	72	64
13	8	36	28
14	12	60	48
15	8	48	40
16	4	28	24
17	4	28	24
18	4	28	24
19	8	32	24
20	8	28	20
21	16	24	8
22	8	28	20
23	12	32	20
24	8	32	24
25	12	28	16
Mittel- werte und 3-facher mittlerer Fehler	8 ± 2	38 ± 7	30 ± 8

Tab. 3 Zeitlicher Verlauf der Embryobildung an Kulturen verschiedener Gewebestämme der RR und LF auf M_S-Medium.

Die Angaben in Wochen bezeichnen die Zeit nach der Isolierung der Gewebe. Jeder Stamm umfaßte 4 bis 12 Kulturen.

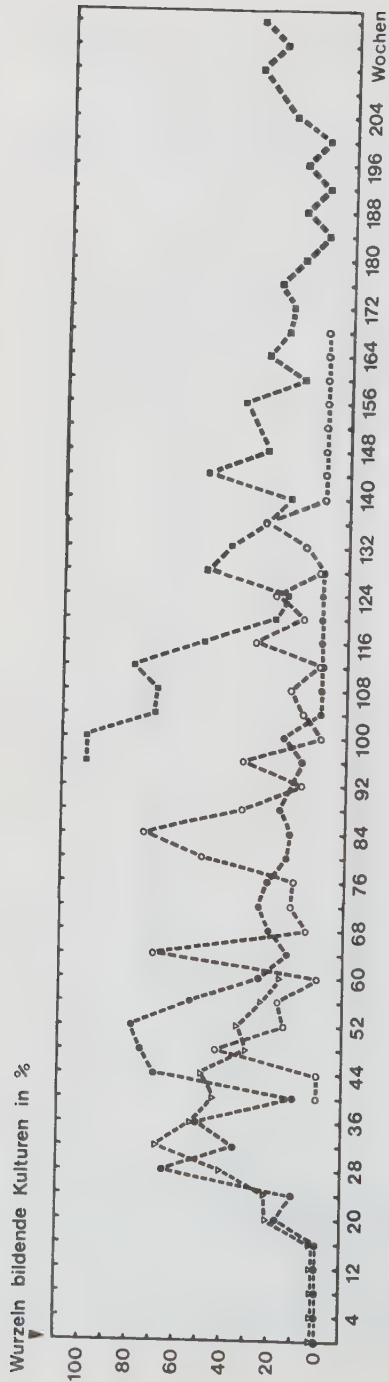


Abb. 3 Verlauf der Wurzelbildung an frisch isolierten und älteren Kulturen aus Karotten auf " M_W ".
Jede Kurve repräsentiert die Ergebnisse einer Versuchsreihe mit parallel angelegten Gewebestämmen der RR.

▽---▽ 6 Stämme (30 - 40 Kulturen); ●---● 4 Stämme (16 - 20 Kulturen); ○---○ 3 Stämme (18 - 20 Kulturen) Registrierung der Wurzeln beginnt erst 40 Wochen nach der Isolierung der Kulturen.
■---■ 5 Stämme (20 - 30 Kulturen) Registrierung erst 96 Wochen nach der Isolierung.
Ordinate: Wurzeln bildende Kulturen in %. Abszisse: Zeit nach der Isolierung in Wochen.

In seltenen Fällen wurden auf "M_S" außer den Embryonen auch einzelne Wurzeln gebildet. Ihre Häufigkeit lag aber stets unter 5%.

Gänzlich anders als die M_S-Kulturen verhielten sich Explantate gleichen Ursprungs, die aber seit der Isolierung auf "M_W" wuchsen. Auf diesem Medium traten als einzige Regenerationen am auffallend langsamer wachsenden Kallus nur Wurzeln auf. Im Gegensatz zum Verlauf der Embryogenese auf "M_S" zeigt die Wurzelbildung auf "M_W" keinen einheitlichen Verlauf. (Abb. 3). Neben starken Schwankungen zwischen den Werten verschiedener Versuchsserien ergab sich auch für Kulturen aus demselben Versuchsansatz kein einheitliches Maximum. Es zeigt sich aber klar, daß die Bereitschaft zur Wurzelbildung relativ spät einsetzt, bei den hier untersuchten 10 Gewebestämmen der RR mit insgesamt 60 Kulturen erst 20 Wochen nach der Isolierung der Explantate. Andererseits bleibt die Bereitschaft zur Rhizogenese offensichtlich länger erhalten, als die Fähigkeit gleich alter Parallelkulturen zur Embryogenese auf "M_S". M_W-Kulturen waren teilweise noch im Alter von mehr als 4 Jahren in der Lage Wurzeln zu bilden. (Abb. 3).

2. Kontrolle der Embryo- und Wurzelbildung in älteren Kulturen.

Obwohl während mehrjähriger Subkultur auf "M_W" in keinem Fall Embryonen entstanden, besaßen diese Kulturen doch latent die Fähigkeit zur Embryogenese. Das zeigte sich deutlich, wenn die Kalli unter den induktiven Einfluß des M_S-Mediums gebracht wurden. Sowohl jüngere (wenige Wochen), als auch ältere Gewebe (mehrere Jahre) waren nach einer Übertragung von "M_W" auf "M_S" in der Lage Embryonen zu bilden. Der zeitliche Verlauf der Embryogenese gleicht auch in diesen Fällen dem "Normalverlauf": Nach Erreichen

Embryonen bildende Kulturen in %

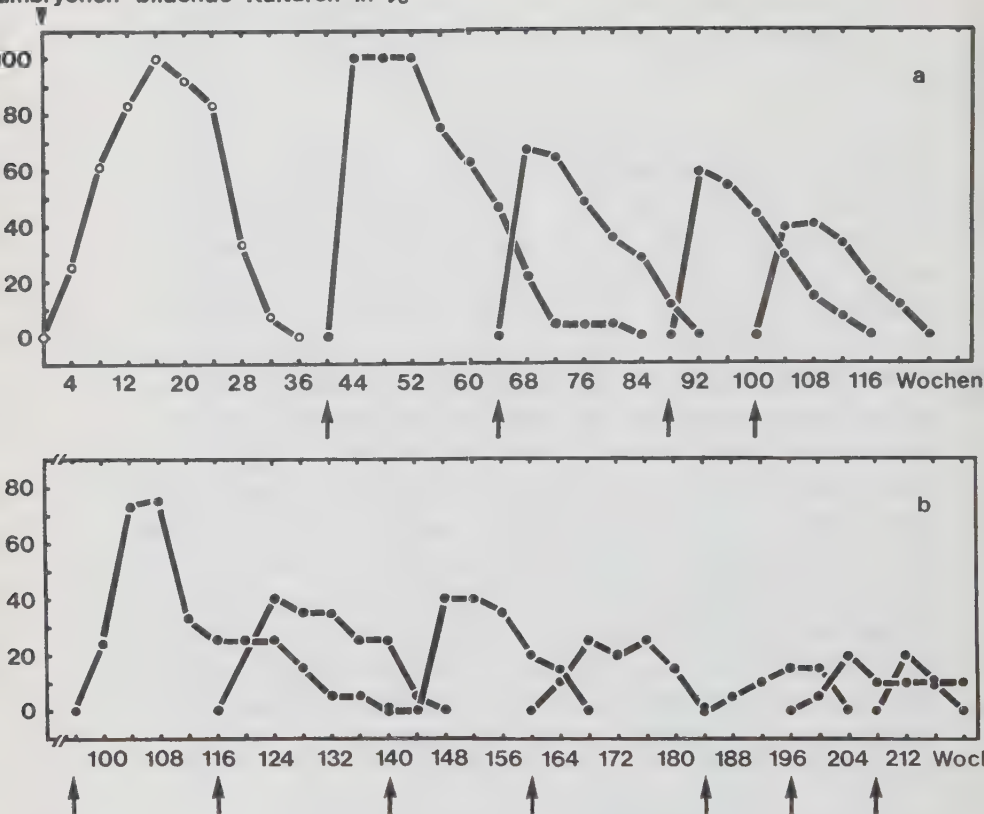


Abb. 4 Erhaltung der Fähigkeit zur Embryobildung unter nicht-induktiven Bedingungen.

Durch einen Wechsel des Nährmediums von " M_W " (nicht-induktiv) zu " M_S " (induktiv) läßt sich die Embryobildung auch an älteren Kulturen auslösen (●—●).

- a) Versuchsserie mit 3 Stämmen der LF. Die Pfeile bezeichnen den Beginn einer Versuchsreihe (●—●) mit je 20 - 24 Kulturen. (o—o) Embryobildung der Kontrollen auf " M_S " isoliert und subkultiviert.
- b) Versuchsserie mit 5 Stämmen der RR mit 20 bis 30 Kulturen für jede Versuchsreihe (●—●).

Die Kontrollkulturen auf " M_W " bildeten in keinem Fall Embryonen.

Ordinate: Embryonen bildende Kulturen in Prozent.

Abszisse: Zeit nach der Isolierung der Explantate in Wochen.

eines Maximums fällt der Prozentsatz embryonenbildender Kulturen wieder ab, um nach einiger Zeit ebenfalls zu erlöschen (Abb. 4).

Durch sukzessives Umsetzen der Kontrollkulturen von " M_W " auf " M_S " lassen sich auch mit fortschreitendem Alter an den Stammkulturen beliebig Embryonen induzieren. In einer Versuchsserie mit 20 Kulturen der LF war das z.B. möglich nach 40-, 64-, 88-, bzw. 100-wöchiger Vorkultur auf " M_W " (Abb. 4a). Eine zweite Versuchsserie mit 20 Kulturen der RR ergab noch im Alter von >4 Jahren positive Reaktionen (Abb. 5b), insbesondere zu einer Zeit, da die parallel auf " M_S " isolierten und subkultivierten Stämme die Embryobildung längst eingestellt hatten.

Obwohl durch die Kultur unter nicht-induktiven Bedingungen (" M_W ") die morphogenetische Fähigkeit des *Daucus*-Kallus über längere Kulturperioden erhalten bleibt, zeigt sich auch hier mit fortschreitendem Alter der Gewebe eine abnehmende Bereitschaft zur Embryogenese. Während 1 1/2 Jahre nach der Isolierung bei einigen Stammgeweben noch teilweise an 100% der Kulturen Embryonen induziert werden könnten, lagen die Maxima in späteren Versuchen deutlich niedriger (Abb. 4).

Im Zusammenhang mit der Frage, ob die Zellen während längerer Subkultur auf " M_S " durch genetische Veränderungen bzw. durch Verlust eines spezifischen Faktors, der nicht länger synthetisiert werden kann (GAUTHERET 1966) irreversibel die Fähigkeit zur Embryogenese verlieren, wurden mehrere Möglichkeiten geprüft, die Embryobildung erneut in Gang zu setzen. Dazu wurden zu " M_S " verschiedene Substanzen zugesetzt, die sich in anderen Fällen als besonders fördernd für die Bildung von Regeneraten in Gewebekulturen erwiesen haben (SKOOG und MILLER 1957; VASIL und HILDEBRANDT 1966).

Embryonen bildende
Kulturen in %

Wurzeln bildende
Kulturen in %

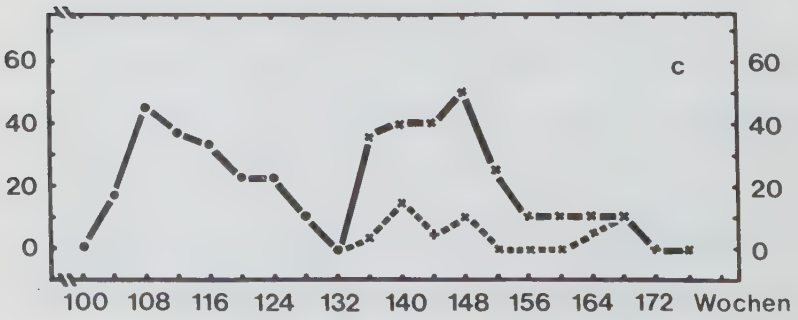
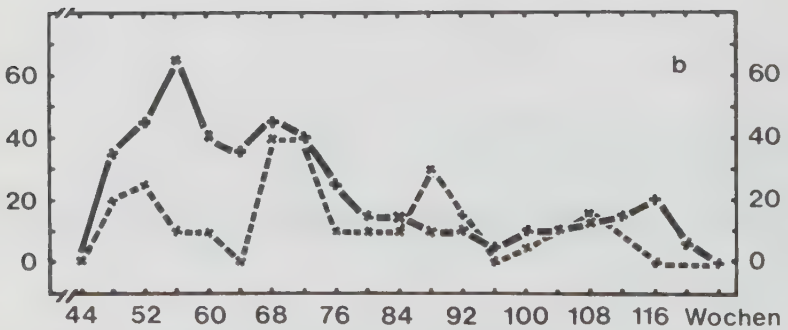
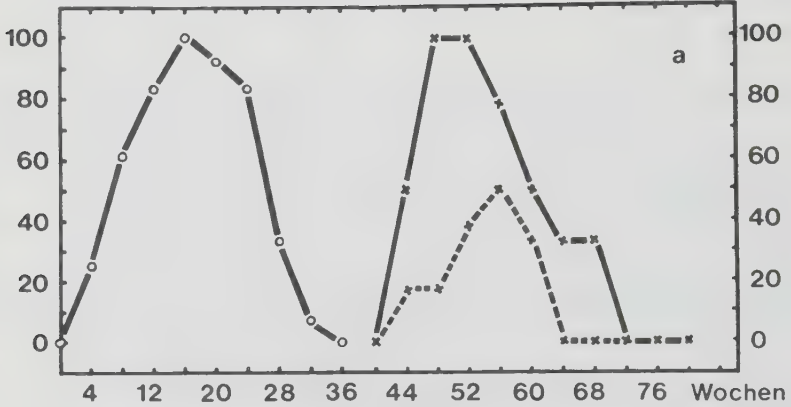


Abb. 5

Eine Erhöhung der Stickstoffkonzentration in Form von KNO_3 und / oder NH_4NO_3 auf das Doppelte der Konzentrationen in " M_S " oder ein Zusatz von Glutaminsäure (6g/l) zu " M_S " konnten an 2 Jahre alten Kulturen keine Embryonen induzieren. Ebenso unwirksam waren die Purinderivate Kinetin in den Konzentrationen 10^{-7} , 10^{-6} und 10^{-5} g/ml, sowie Adeninsulfat der Konzentrationen 2×10^{-5} , 10^{-5} und 10^{-6} g/ml.

Dagegen bewirkte das bekannte Prinzip des Auxinentzugs (REINERT 1959; HALPERIN und WETHERELL 1964) hier in diesem speziellen Fall die Wiederinduktion von Embryonen in älteren Kulturen, die die Embryobildung bereits eingestellt hatten.

Abb. 5 Wiederinduktion von Embryonen und Wurzelbildung an älteren Kulturen durch Entzug des Auxins aus " M_S ".

- a) Embryobildung (o—o) an 3 Stämmen der LF nach Isolierung und Subkultur auf " M_S ". Embryo- (x—x) und Wurzelbildung (x---x) nach Übertragung derselben Kulturen auf " M_S minus 2,4-D". Versuchsreihe mit 20 - 24 Kulturen.
- b) Langdauernde Embryo- (x—x) und Wurzelbildung (x---x) auf " M_S minus 2,4-D". Die Kulturen zeigten noch 80 Wochen nach dem Auxinentzug gutes Wachstum. Versuchsreihe mit 2 Stämmen der RR mit insgesamt 18 Kulturen.
- c) Embryo- (x—x) und Wurzelbildung (x---x) auf " M_S minus 2,4-D" an 5 Stämmen der RR, die nach anfänglicher Vorkultur auf " M_W " ihre embryonenbildende Phase auf " M_S " (●—●) erst im Alter von 100 - 132 Wochen durchlaufen hatten. Versuch mit 20 Kulturen.

Ordinaten: Embryonen- bzw. Wurzeln bildende Kulturen in Prozent.
Abszissen: Zeit nach der Isolierung in Wochen.

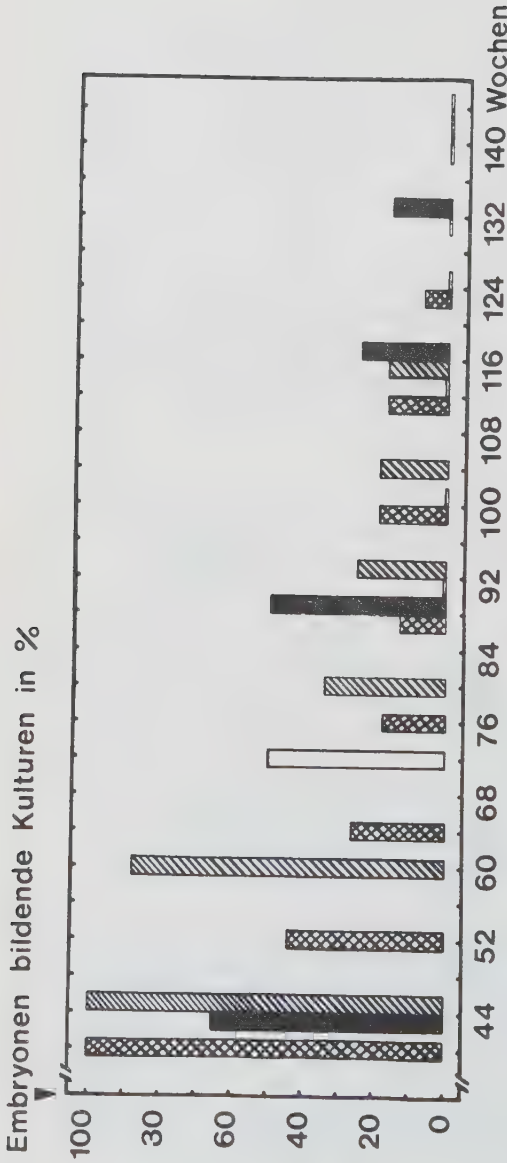


Abb. 6 Wiederinduktion von Embryonen durch Auxinentzug.

Jede Säule entspricht dem maximalen Prozentsatz Embryonen bildender Kulturen innerhalb einer bestimmten Versuchsreihe. Identische Schraffuren bezeichnen wiederholte Ansätze mit denselben Stammkulturen.

- ▨ Versuchsserie mit 4 Stämmen der LF (20 bis 30 Kulturen),
- Versuchsserie mit 4 Stämmen der RR (16 bis 20 Kulturen),
- ▨ Versuchsserie mit 4 Stämmen der RR (20 bis 24 Kulturen),
- Versuchsserie mit 5 Stämmen der RR (20 Kulturen).

Ordinate: Embryonen bildende Kulturen in Prozent.

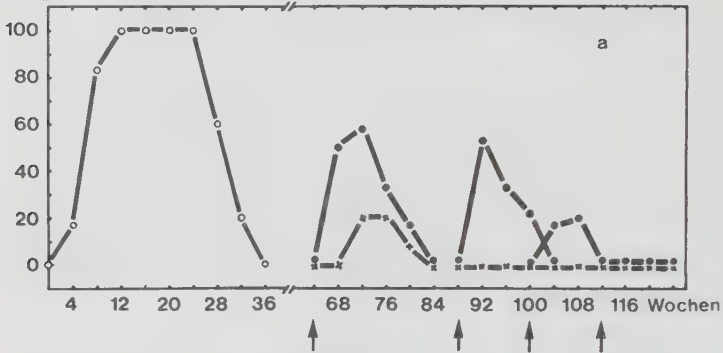
Abszisse: Zeitpunkt des Ansatzes einer Versuchsreihe in Wochen nach der Isolierung der Kulturen.

Sowohl Kulturen, die auf "M_S" isoliert und subkultiviert waren (Abb. 5a, b), als auch Gewebe, die erst nach anfänglicher Vorkultur auf "M_W" zu einem späteren Zeitpunkt (hier nach 100 Wochen) ihre embryonenbildende Phase auf "M_S" durchlaufen hatten (Abb. 5c), gewannen auf 2,4-D-freiem "M_S" ihre volle Regenerationsfähigkeit zurück. Erstmals entstanden an diesen Kulturen als Folge des Auxinentzugs außer den Embryonen regelmäßig auch einzelne Wurzeln (Abb. 5, x-x).

Während der ersten 2 bis 3 Übertragungsperioden zeigten die Kulturen in der Regel auch ohne das Auxin gutes Wachstum; i.a. wurden die Gewebe aber später nekrotisch und stellten schließlich das Wachstum ein. In einigen Fällen waren die Kulturen erstaunlich lange Zeit in der Lage ohne 2,4-D zu wachsen und Regenerate zu bilden, hier am Beispiel von zwei Stämmen der RR bis zu 80 Wochen nach dem Auxinentzug (Abb. 5b).

Es ließen sich an denselben Stammkulturen sogar mehrmals Embryonen induzieren, wenn Teile der Kontrollkulturen in bestimmten Zeitabständen von "M_S" auf "M_S minus 2,4-D" übertragen wurden. Jedoch nahm der Prozentsatz der Embryobildung als Reaktion der Kulturen auf den Auxinentzug mit fortschreitender Kulturdauer ab. Während bis zum Alter von 1 Jahr die Gewebe noch sämtlich reagierten und teilweise 100%ig Embryonen bildeten, lag der Prozentsatz in Versuchen mit älteren Kulturen erheblich niedriger (Abb. 6). Nach Ablauf von 140 Wochen war an M_S-Kulturen durch 2,4-D-Entzug keine Wiederinduktion von Embryonen mehr möglich.

Embryonen bildende Kulturen in %



Embryonen bildende Kulturen in %

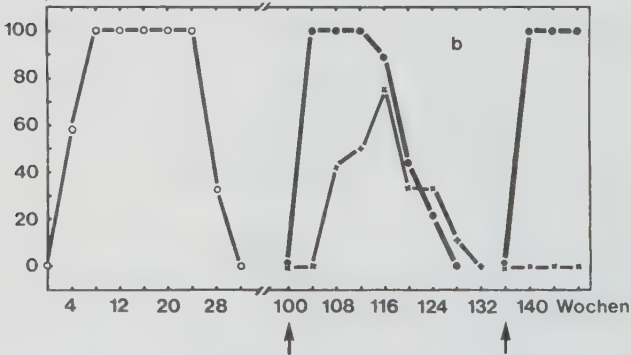


Abb. 7 Variabilität der Embryobildung bei verschiedenen Stämmen der LF.

- (o—o) isoliert und subkultiviert auf "M_S";
- (●—●) isoliert auf "M_W" und auf "M_S" übertragen;
- (x—x) ursprünglich auf "M_S", später nach Verlust der Fähigkeit Embryonen zu bilden, auf "M_S minus 2,4-D".

Stamm a: 9 bis 15 Kulturen pro Versuchsreihe.

Stamm b: 9 bis 18 Kulturen pro Versuchsreihe.

Ordinate: Embryonen bildende Kulturen in Prozent.

Abszisse: Zeit in Wochen nach der Isolierung.

3. Unterschiedliche Reaktion verschiedener Stammkulturen.

Kulturen eines Einzelstammes - gemeint sind Gewebe, die sich von den Explantaten derselben Rube ableiten - unterscheiden sich von den Kulturen eines anderen Stammes nicht nur in Pigmentierung, Wuchsform und Wachstumsgeschwindigkeit, sondern vor allem auch in Bezug auf die Dauer ihrer Fähigkeit zur Embryobildung. Das zeigt ein Vergleich von 2 parallel isolierten Stämmen der LF (Abb. 7). Obwohl in beiden Fällen (a und b) der Normalverlauf der Embryobildung auf "M_S" (o—o) fast identisch ist, besteht ein deutlicher Unterschied in bezug auf die Zeitspanne, in der die Wiederinduktion durch Auxinentzug (x—x) noch möglich ist. So führt z.B. der Entzug von 2,4-D an Kulturen des Stammes (a), die 88 Wochen auf "M_S" subkultiviert worden sind, zu keiner erneuten Bildung von Embryonen. Im Gegensatz dazu erreichen die Kulturen des Stammes (b) noch nach 100 Wochen einen Maximalwert von 67% für Embryobildung und reagieren erst im Alter von 136 Wochen nicht mehr auf den Auxinentzug.

Die Reaktion der entsprechenden M_W-Kulturen auf das induktive M_S-Medium (●—●) ergeben ein ähnliches Bild. So wird z.B. die Embryobildung von Stamm (a) im Alter von 112 Wochen eingestellt, der Schwesterstamm (b) erreicht zu dieser Zeit und auch noch später (nach 136 Wochen) 100%ige Embryobildung.

In der folgenden Auswertung wird das Verhalten von sämtlichen untersuchten Stammkulturen berücksichtigt und in Abhängigkeit von der Kulturzeit in vitro die Fähigkeit einzelner Stämme zur Embryobildung miteinander verglichen (Abb. 8).

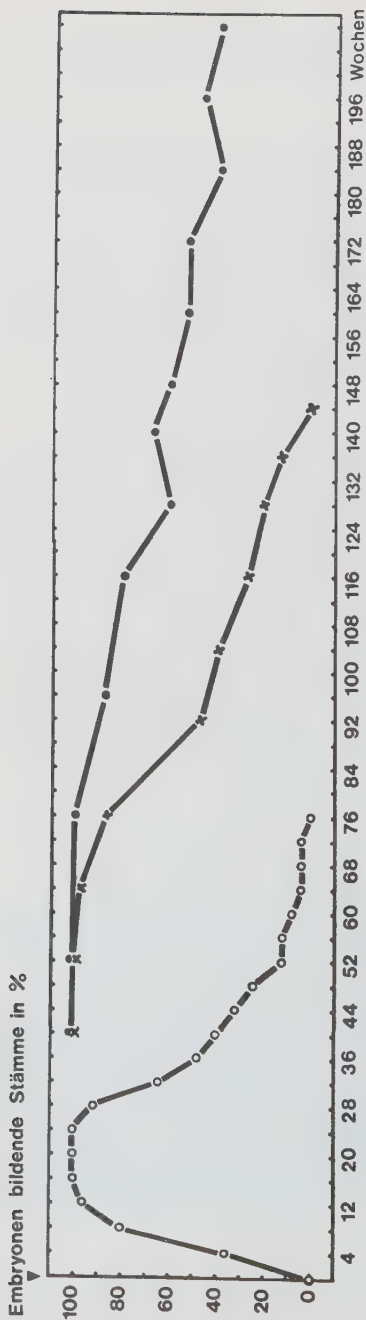


Abb. 8 Unterschiedliche Dauer der Fähigkeit zur Embryobildung bei verschiedenen Stämmen der LF und RR.

(o--o) 25 Stämme à 4 bis 12 Kulturen auf "M₅" isoliert und subkultiviert; (x--x) 15 Stämme à 4 bis 12 Kulturen ursprünglich auf "M₅", später nach Verlust der Fähigkeit Embryonen zu bilden, auf "M₅ minus 2,4-D; (●--●) 15 Stämme à 4 bis 12 Kulturen isoliert auf "M_W" und auf "M₅" übertragen.

Ordinate: Embryonen bildende Stämme in Prozent.

Abszisse: Zeit nach der Isolierung in Wochen (gilt für o--o) bzw. Zeitpunkt des Ansatzes einer Versuchsreihe in Wochen nach der Isolierung der Stämme (gilt für x--x und ●--●).

Auf "M_S" (o—o) beginnen bereits 4 Wochen nach der Isolierung der Explantate 36% der untersuchten 25 Stämme mit der Embryobildung. Der späteste Zeitpunkt des Beginns liegt 16 Wochen nach der Isolierung; im Alter von 16 bis 24 Wochen reagieren alle Stämme. Von der 25. Woche an tritt bereits bei einigen Stämmen ein Verlust der Regenerationsfähigkeit ein; dies ist der früheste Zeitpunkt des Aufhörens der Embryobildung von sämtlichen Kulturen eines Stammes auf "M_S". Nach 36 Wochen reagiert noch etwa die Hälfte der Stämme, gegen Ende des ersten Jahres bis zum Alter von 72 Wochen entstehen Embryonen nur noch in Ausnahmefällen.

Durch Auxinentzug aus "M_S" läßt sich im Alter von 1 Jahr noch an 100% der untersuchten 15 Stämme die Embryobildung erneut anregen(x—x). Die ersten negativen Reaktionen sämtlicher Kulturen eines Stammes auf den Auxinentzug zeigen sich bei 64 bis 76 Wochen alten Stämmen. Mit fortschreitender Kulturzeit nimmt dann die Regenerationsfähigkeit kontinuierlich ab, um spätestens nach 144 Wochen gänzlich zu löschen.

Die größte Variabilität der Stämme in bezug auf die Fähigkeit zur Embryobildung zeigt sich an Kulturen, die in regelmäßigen Zeitabständen von "M_W" auf "M_S" übertragen wurden (●—●). Während die ersten Stämme bereits im Alter von 96 Wochen auf die induktiven Bedingungen des M_S-Mediums nicht mehr reagieren, kann diese Fähigkeit bei parallel wachsenden Stämmen noch am Anfang des 5. Jahres erhalten bleiben.

II/1 Teilungswachstum isolierter Einzelzellen auf synthetischem Medium.

Um verschiedene Fragen zur Bildung von Embryonen in Karottenkulturen zu klären, sollte die Embryogenese an isolierten Einzelzellen direkt beobachtet werden. Zur sinnvollen Durchführung der Versuche war es erforderlich; zunächst einige grundlegende Tatsachen über das Wachstum von isolierten Karottenzellen festzustellen.

Die höchsten Teilungsraten von Einzelzellen aus Karottenkallus ermöglicht das synthetische Agarmedium "MS₁" - eine modifizierte Form des Mediums nach MURASHIGE und SKOOG (1962) - das haben vorangegangene Versuche mit verschiedenen gebräuchlichen Standardnährlösungen eindeutig ergeben (BACKS 1967).

Im folgenden wird die Abhängigkeit des Teilungswachstums der Einzelzellen aus Karottenkallus von benachbart wachsenden Geweben untersucht und gleichzeitig die günstigste Beimpfungsmenge zum optimalen Wachstum der isolierten Zellen ermittelt.

Die Kulturen des verwendeten Gewebestammes der LF wuchsen seit der Isolierung aus einer gelagerten Rübe bereits 4 Monate auf "MS₁"*. Der Kallus erreichte innerhalb jeder 4-wöchigen Übertragungsperiode das 9- bis 10-fache seines Ausgangsgewichtes von ca. 150 mg und bildete bis zu 8 Monate nach der Isolierung zunächst regelmäßig - später nur noch vereinzelt nach dem Ausstreichen auf den Platten - an der Oberfläche und den Außenrändern größerer Zellkolonien globuläre, herzförmige bzw. torpedoförmige Stadien von Adventiv-

*"MS₁" unterscheidet sich von "MS" im wesentlichen durch zusätzlich enthaltenes Myoinositol (vgl. METHODE), das weder das Wachstum noch die Organbildung der Karottenkulturen nennenswert beeinflusst (REINERT unveröffentlicht).

embryonen (vgl. Abb. 15). Zur Zeit der letzten Versuche hatte das 9 bis 11 Monate alte Gewebe die Embryobildung gänzlich eingestellt. Abgesehen davon konnte während der Dauer der Versuche an der Stammkultur keine wesentliche Konsistenzänderung beobachtet werden. Der Kallus war von Anfang an gelblichweiß, etwas glasig, aber sehr weich und ergab beim Rollen auf der Agaroberfläche ohne Schwierigkeiten zahlreiche Einzelzellen.

Versuchsgruppe I. Kallus aus einer einzelnen Kultur wurde für jede Versuchsreihe in Mengen zu 0,4g; 0,2g und 0,1g (oder 0,05g) - Genauigkeit: $\pm 10\text{mg}$ - auf drei Agarplatten verstrichen und das Verhalten der Einzelzellen innerhalb einer dreiwöchigen Versuchszeit beobachtet. Die prozentualen Zellteilungsraten aus 6 bis 10 Einzelversuchen wurden für jede Gewichtsklasse zu einem Mittelwert zusammengefaßt. In der Auswertung wurden Ergebnisse mit den Gewichtseinheiten 0,1 g und 0,05 g einer Klasse (0,1 g) zugeordnet.

Beimpfungsgewicht	0,4 g	0,2 g	0,1 g
Teilungen der Einzelzellen in %			
nach 1 Woche	61	32	36
nach 2 Wochen	86	80	61
nach 3 Wochen	88	83	64
Maximum in %	93	97	83
Minimum in %	73	73	40

Tab. 4 Teilungswachstum isolierter Einzelzellen aus Kalluskulturen von *Daucus carota* (LF) bei unterschiedlichen Beimpfungsgewichten.

Die Zahlen bezeichnen prozentuale Mittelwerte für geteilte Zellen aus je 6 bis 10 Versuchen. Auf jeder Platte wurden 30 Einzelzellen beobachtet.

Der Vergleich der Beimpfungsgewichte 0,4 g und 0,2 g mit Mittelwerten von 88% und 83% für geteilte Einzelzellen ergab keinen wesentlichen Unterschied (Tab. 4).

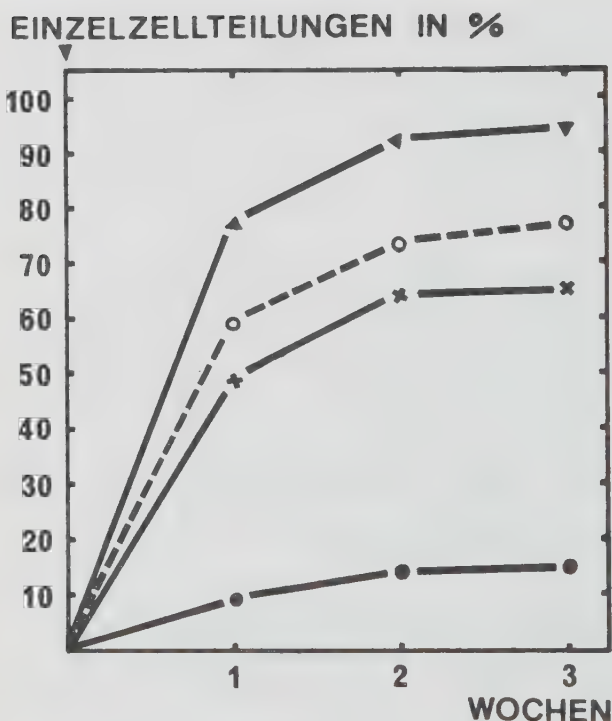


Abb. 9 Teilungswachstum isolierter Einzelzellen von *Daucus carota* auf frischem synthetischen Medium nach Beimpfung mit 400 mg (▼—▼); 50 mg (x—x) und ≤ 20 mg (●—●), sowie auf konditioniertem Medium mit ≤ 20 mg (o--o) Kallus. Jeder Kurvenpunkt entspricht dem prozentualen Mittelwert der Einzelzellteilungen aus 6 bis 10 Versuchen. Pro Platte wurden 30 Einzelzellen beobachtet.

Ordinate: Prozentsatz geteilter Einzelzellen.
Abszisse: Versuchszeit in Wochen.

Bei Verwendung von 0,1 g war die Teilungsrate auf 64% im Mittel eingeschränkt. Durch statistischen Vergleich der Ergebnisse nach dem t-Test erwies sich dieser Unterschied als nicht signifikant. Eine Förderung der Zellteilung durch höhere Gewebedichte und damit die Abhängigkeit des Teilungswachstums der isolierten Zellen von benachbarten wachsenden Geweben ließ sich bei den untersuchten Beimpfungsgewichten nicht feststellen.

Versuchsgruppe II. Gewebemengen um 0,1 g können bei der verwendeten Fläche und dem Volumen des Nähragars in einigen Fällen noch optimale Bedingungen zur Teilung der Einzelzellen liefern. Das hat schon der Maximalwert von 83% für geteilte Zellen auf einer Platte mit 0,1 g Ausgangsgewebe gezeigt. Um festzustellen, bis zu welcher Mindestmenge ein gleichmäßiges Wachstum von isolierten Einzelzellen möglich ist, mußte das Beimpfungsgewicht weiter herabgesetzt werden.

Versuchsreihen mit Beimpfungsgewichten von 50 mg und 20 mg bzw. 10 mg (Genauigkeit: ± 1 mg) brachten klare Ergebnisse (Abb. 9). Die höchsten Teilungszahlen mit durchschnittlich 94% (maximal 100%) erreichten die Einzelzellen auf den Kontrollplatten in Gegenwart von 400 mg Beimpfungsgewebe. Während 50 mg ebenfalls noch ausreichten, zahlreiche Teilungen zu ermöglichen (Mittel 65%, Maximum 93%) wurde bei einer Beimpfungsmenge von ≤ 20 mg das Teilungswachstum auf 15% im Mittel eingeschränkt. Schon nach einer Versuchswoche ergaben sich signifikante Unterschiede zwischen den Werten für geteilte Einzelzellen aus den Klassen 400 mg und ≤ 20 mg bzw. 50 mg und ≤ 20 mg ($p < 0,0027$). Die Differenz zwischen den Klassen 400 mg und 50 mg ließ sich dagegen nur schwach sichern ($0,05 > p > 0,01$).

Analog den Ergebnissen mit Vitis-Tumorzellen (REINERT und v.ARDENNE 1964) beeinflußt die Beimpfungsmenge

auch bei den Kalluszellen den Zeitpunkt der ersten Teilung. Auf dicht beschickten Platten (400 bis 50 mg) teilte sich die Mehrzahl der Einzelzellen zwischen dem 3. und 6. Versuchstag, während bei niedrigen Beimpfungsgewichten (20 bzw. 10 mg) die Teilungen um weitere 3 Tage verzögert und nur noch in Ausnahmefällen möglich waren.

Durchschnittlich 65% der geteilten Einzelzellen setzten das Teilungswachstum stetig fort und bildeten innerhalb der dreiwöchigen Versuchszeit vielzellige Kolonien bis zu 50 Zellen. Weitere 25% bildeten kleine Zellgruppen bis zu 8 Zellen, die in einigen Fällen das Wachstum nach wenigen Teilungen einstellten. Von den Einzelzellen, die innerhalb von 3 Wochen ungeteilt blieben, starb ein hoher Prozentsatz ab, d.h. diese Zellen plasmolysierten oder wurden nekrotisch.

"Konditioniertes Medium". Die Lebensfähigkeit sowie das Teilungswachstum der isolierten Zellen wird offensichtlich über eine stoffliche Veränderung des Nährbodens beeinflusst, denn auf "konditioniertem Medium" (REINERT und v. ARDENNE 1964) konnten isolierte Einzelzellen der LF auch ohne die Gegenwart von Nachbargeweben Kolonien bilden. Als konditioniertes Medium wurde Nährboden benutzt, der zuvor 10 bis 14 Tage von Kallus bewachsen war und zur erneuten Verwendung im siedenden Wasserbad verflüssigt wurde.

Gegenüber 15% Teilungen auf frischem Medium ließ sich die Teilungsrate der Einzelzellen auf konditioniertem Medium bei geringer Beimpfungsmenge (20 bzw. 10 mg) auf 76% steigern (Abb. 9).

Ein gleichmäßiges Teilungswachstum von isolierten Einzelzellen aus Karottenkallus erfordert demnach bei der verwendeten Fläche (ca. 11 cm²) und dem Volumen des synthetischen Nähragars (15 ml) entweder eine verhältnismäßig hohe Gewebemenge (200 bis 400 mg) oder ein konditioniertes Medium.

2. Verlauf der Embryobildung aus isolierten Zellen.

Die vorstehenden Resultate über den zeitlichen Verlauf der Embryobildung im Kallus und die Ergebnisse über das Wachstum von isolierten Zellen auf Agarplatten bilden die Grundlage für die folgenden Untersuchungen über die Fähigkeit isolierter Einzelzellen zur Embryogenese.

Ausgangsmaterial war Kallus von 16 bis 20 Wochen alten, gutwachsenden Kulturen der LF, die zu dieser Zeit auf "M_S" die stärkste Bereitschaft zur Embryobildung zeigten (vgl. Abschnitt I/1).

Die Kulturen enthalten in diesem Alter neben verschiedenen embryonalen Entwicklungsstadien Kalluszellen, die sich morphologisch deutlich voneinander unterscheiden. Zum größten Teil sind das vakuolisierte Zellen unterschiedlicher Größe mit unterschiedlichen Zahlen von Stärkekörnern (Abb. 10). Neben diesem Zelltyp finden sich Gruppen aus kleinen isodiametrischen (ca. 10 μ Durchmesser), meist stark gegeneinander abgerundeten Zellen, die dicht mit Plasma und anderen Zelleinschlüssen angefüllt sind (Abb. 10). Dieser Typ der embryonalen Zelle liegt in der Regel in festen Komplexen vor, die kaum dissoziieren und deshalb nur selten als Einzelzelle vorkommen (Abb. 10, Pfeile).

T e i l u n g u n d D i f f e r e n z i e r u n g p a r e n c h y m a t i s c h e r E i n z e l - z e l l e n .

Parenchymatische Einzelzellen aus den 16 bis 20 Wochen alten Kulturen der LF verhielten sich bei der Kultur auf Agarnährboden in Petrischalen in bezug

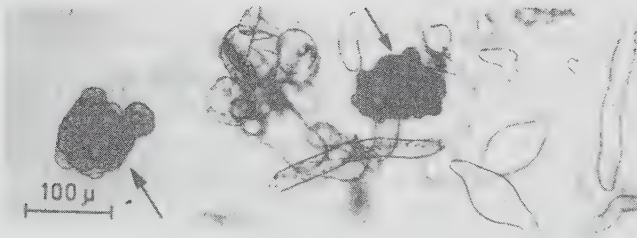


Abb. 10

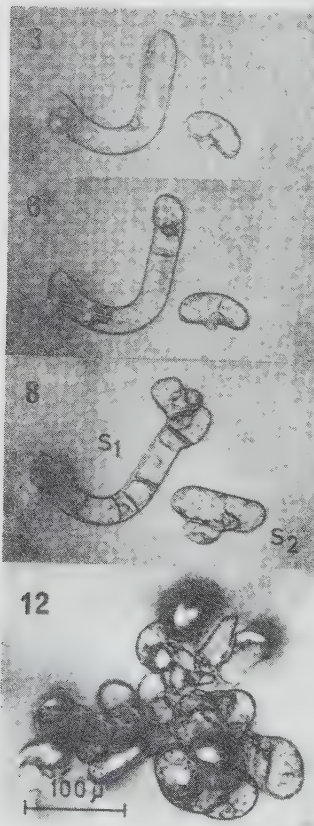


Abb. 11 a



Abb. 11 b

auf Teilung und Differenzierung unterschiedlich. Entweder entstanden aus den Zellen nach anfänglicher Septierung oder Sprossung durch darauffolgendes Streckungswachstum erneut parenchymatische Zellkolonien (Abb. 11a) oder die Einzelzellen wandelten sich durch stärkere Septierung in die schon erwähnten kleinen embryonalen Zellen um (Abb. 11b und 12).

Diese Umwandlung parenchymatischer Zellen in embryonale Zellen verlief z.B. in der Abb. 11b und 12 dargestellten Form. Eine vakuolisierte, langgestreckte Einzelzelle teilt sich senkrecht zur Längsachse. Dabei entstehen zwei "inäquale" Tochterzellen, die sich in bezug auf das weitere Verhalten deutlich unterscheiden. Eine Tochterzelle teilt sich häufig und wird durch kurzfristig aufeinanderfolgende Teilungen stark septiert (Abb. 11b, Nr. 10-17, Abb. 12, Nr. 8), während sich die andere Tochterzelle entweder nur streckt oder außerdem noch wenige Teilungen durchmacht. Auf der Seite der starken Septierung entstehen die oben beschriebenen kleinen plasmareichen Zellen (Abb. 12, Nr. 15), die sich gegeneinander abrunden und so zunächst anscheinend ungeordnete Zellkomplexe bilden.

Abb. 10 Zelltypen aus 20 Wochen alten Gewebekulturen von *Daucus carota*.

Neben stark vakuolisierten "parenchymatischen" Zellen in verschiedenen Größen kommen Gruppen aus fest zusammenhängenden, isodiametrischen, plasmareichen Zellen (s. Pfeile) vor. Für die photographische Aufnahme wurde der Kallus in Nährlösung aufgeschwemmt.

Abb. 11 Teilungsmuster isolierter Einzelzellen auf Agarmedium in Petrischalen,

Beimpfungsgewicht: 400 mg. (a) Septierung "S₁" und Sprossung "S₂" von Einzelzellen, die nur zur Bildung von vakuolisierten (12), aber nicht von plasmareichen, embryonalen Zellen führen. (b) Entstehung von embryonalen Zellen aus einer vakuolisierten Einzelzelle durch inäquale Teilung (6) und anschließende Septierung in kleine Zellen (10-17, s. Pfeile). Die Zahlen auf den Abbildungen bezeichnen die Anzahl der Tage nach der Isolierung der Einzelzellen.

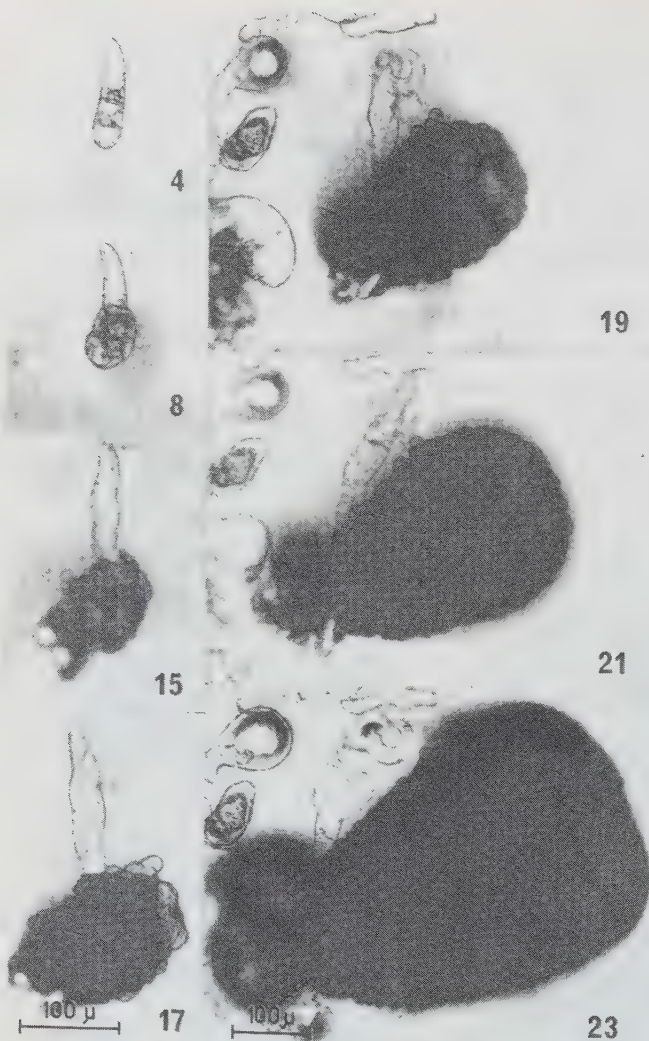


Abb. 12 Embryobildung einer isolierten Einzelzelle
auf Agarmedium in einer Petrischale,
beginnend mit einer inäqualen Teilung (4), darauf
folgender Bildung eines Komplexes aus kleinen, plasma-
reichen Zellen (8-17), aus denen später der herzför-
mige Embryo (23) entsteht. Versuchsdauer: 4 Wochen.
Beimpfungsgewicht: 400 mg. Die Zahlen auf den Abbil-
dungen bezeichnen die Anzahl der Tage nach Isolierung
der Einzelzelle.

Der Ausbildung dieser embryonalen Zellkomplexe ging in isoliert liegenden Einzelzellen regelmäßig die oben beschriebene "inäquale" Teilung voraus. Es sind aber auch Ausnahmen beobachtet worden, z.B. Einzelzellen, die unmittelbar neben anderen Zellen lagen und im Verlauf des Wachstums mit Nachbarzellen direkten Kontakt bekamen. Solche Einzelzellen konnten sich auch ohne vorangegangene "inäquale" Teilung vollständig in embryonale Zellkomplexe umwandeln.

Embryobildung durch parenchymatische Einzelzellen.

Von den beiden Zelltypen in Karottenkulturen sind zuerst die parenchymatischen Zellen genauer in Hinsicht auf ihre Fähigkeit zur Embryobildung untersucht worden. Ein typisches Beispiel für ihr Verhalten sind die folgenden Ergebnisse mit 82 isolierten Einzelzellen. Von diesen Zellen teilten sich innerhalb von 4 Wochen 57 (=69%). Von den geteilten Zellen wuchsen 39 (=68%) zu Kolonien aus gestreckten, vakuolisierten Zellen heran, während die restlichen 18 (=32%) kleine embryonale Zellen bildeten. Ein Drittel dieser embryonalen Zellkomplexe, die in der oben beschriebenen Form (s. Abb. 11b und 12) aus parenchymatischen Einzelzellen entstanden waren, wuchsen innerhalb der 4-wöchigen Versuchszeit zu globulären bzw. herzförmigen Embryonen heran. Durch Manipulation des Mediums (Entzug von Auxin, REINERT 1959) können diese frühen Embryostadien zur Weiterentwicklung angeregt werden.

Eine typische Serie von Entwicklungsstadien gibt Abb. 12. In diesem Fall hat sich etwa 17 Tage nach Isolierung der Einzelzelle an dem daraus gebildeten embryonalen Zellkomplex die Polaritätsachse des künftigen Embryos ausgebildet. Am 19. Tag ist die Anlage von Cotyledonen zu er-

kennen; nach 23 Tagen ist ein typischer herzförmiger Embryo entstanden. In der Region des Wurzelpols wird ein Teil des anfangs gebildeten proembryonalen Zellkomplexes nicht mit in die Embryoentwicklung einbezogen. Dieser Rest teilt sich ebenfalls weiter auf und kann zu globulären Stadien heranwachsen, die offenbar durch den zuerst entwickelten Embryo am Auswachsen gehindert werden.

Ein Beweis dafür, daß auch die Entwicklungsrichtung der Zellen des entstehenden Embryos nicht endgültig "fixiert" ist, hat sich ebenfalls ergeben. So können z.B. am Wurzelpol der Embryonen (vgl. Abb. 12, 15-23) parenchymatische Zellen entstehen, die auch später nicht mehr am Aufbau des Embryos beteiligt werden.

E m b r y o g e n e s e e m b r y o n a l e r Z e l l g r u p p e n .

Eine notwendige Ergänzung der Ergebnisse mit isolierten parenchymatischen Einzelzellen sind die Beobachtungen über das Verhalten von embryonalen Zellgruppen (Abb. 10, Pfeile) nach der Isolierung auf Agarplatten. Dabei ergaben sich Parallelen zur Embryobildung durch die embryonalen Zellkomplexe, die aus den parenchymatischen Einzelzellen entstanden waren (Abb. 12). Von 30 beobachteten embryonalen Gruppen, deren mittlerer Durchmesser bei der Isolierung durchschnittlich 220μ betrug, wuchsen alle innerhalb von 3 Wochen auf das Vier- bis Fünffache ihres Anfangsdurchmessers heran und bildeten Embryonen (Abb. 13). Dabei gliederte sich die Zellkolonie mit zunehmender Größe zunächst in kleinere embryonale Zellkomplexe, aus denen sich dann globuläre und herzförmige Embryonalstadien entwickelten. Die Zahl der entstehenden Embryonen war von der Größe der ursprünglich isolierten Zellgruppe abhängig.

So gingen z.B. aus einer 12-zelligen meristematischen Gruppe mit einem mittleren Durchmesser von $64\ \mu$ nur 4 Embryonen hervor, während vielzellige Gruppen von ca. $400\ \mu$ Durchmesser bis zu 100 Embryonen ausbildeten.

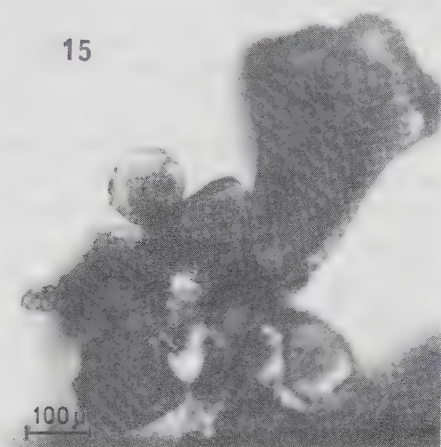


Abb. 13 Bildung von globulären und herzförmigen Embryonalstadien aus einem isolierten embryonalen Zellkomplex (mittlerer Durchmesser $110\ \mu$) auf Agarmedium in einer Petrischale. Versuchsdauer: 15 Tage, Beimpfungsgewicht: 400 mg.

DISKUSSION

Voraussetzung für sinnvolle morphogenetische Untersuchungen an Gewebekulturen sind außer eindeutig definierten synthetischen Kulturmedien auch möglichst genaue Angaben über Änderungen in der Reaktion des Kallus im Verlauf der Subkultur in vitro. Mit den vorliegenden Ergebnissen über die Regenerationsfähigkeit der Zellkulturen von *Daucus carota* werden grundlegende Fragen zur Totipotenz somatischer Zellen geklärt. Außerdem wird die Kenntnis über ein Untersuchungssystem vertieft, mit dessen Hilfe bereits einige wichtige Probleme zur Embryobildung in vitro gelöst wurden (vgl. REINERT, BACKS und KROSING 1966; REINERT, TAZAWA und SEMENOFF 1967; REINERT und TAZAWA 1969; TAZAWA und REINERT 1969). Grundlage dieses Systems sind zwei einfache synthetische Nährmedien, die in einem Fall ("M_S") die Bildung von Embryonen, im anderen Fall ("M_W") die Entstehung von Wurzeln garantieren. Entscheidend für dieses alternative morphogenetische Verhalten ist der unterschiedliche Stickstoffgehalt der beiden Medien.

Schon in früheren Versuchen (REINERT 1967b) hatte sich gezeigt, daß die Kulturen auf "M_S" (hoher Stickstoffgehalt) in bezug auf ihre Fähigkeit zur Embryobildung nicht stabil bleiben, d.h. daß nach längerer Kulturzeit die Embryobildung bei einigen Kulturen nachläßt und in einzelnen Fällen schließlich ganz aufhört. In der vorliegenden quantitativen Untersuchung wurde festgestellt, daß der zeitliche Verlauf der Embryobildung regelmäßig eine charakteristische Phase beschreibt. Durch Vergleich zahlreicher M_S-Kulturen, die aus 25 verschiedenen Mutterpflanzen isoliert waren, ergaben sich jetzt gesicherte Durchschnittswerte für den Beginn dieser Phase (8 ± 2 Wochen nach der Isolierung der Explantate), das Maximum nach 16 bis 20 Wochen und die Beendigung nach 38 ± 7 Wochen der Subkultur auf "M_S".

Betrachtet man im gleichen Zeitraum Kulturen, die seit der Isolierung auf " M_W " wachsen, so kann bei der für dieses Medium charakteristischen Wurzelbildung (REINERT 1967a) kein einheitlicher Verlauf festgestellt werden. Die Kulturen verhalten sich hier sehr unterschiedlich, nachdem die Bildung von Wurzeln erst ca. 20 Wochen nach der Isolierung der Explantate einsetzt. Bei parallel angelegten Stammkulturen können Perioden starker morphogenetischer Aktivität mit Zeiten ungeordneten Kalluswachstums mehrmals abwechseln. Möglicherweise hängt dieses Verhalten mit der geringen Wachstumsgeschwindigkeit auf dem stickstoffarmen Medium zusammen, so daß in manchen Fällen eine vierwöchige Kulturzeit zur Neubildung der Wurzeln nicht ausreicht, nachdem sie zuvor bei der letzten Übertragung aus dem Gewebe entfernt wurden. Auffallend im Vergleich zur Embryobildung ist die relativ lange Dauer der Fähigkeit zur Wurzelbildung, die frühestens nach zweijähriger Kulturzeit eingestellt wird, in einzelnen Fällen aber noch am Anfang des 5. Jahres andauert.

Durch diese Ergebnisse über den zeitlichen Verlauf der Embryo- und Wurzelbildung während längerer Subkultur sind erstmals Eigenschaften systematisch erfaßt worden, die nicht nur für Karottenkallus zutreffen, sondern in der Regel bei der Organbildung pflanzlicher Zellen in vitro auftreten. Abgesehen von einzelnen permanent regenerierenden Kulturen (GAUTHERET 1945; MOREL 1948; MOREL und WETMORE 1951) sind zahlreiche Beispiele bekannt, in denen Kalluskulturen aus Karotten (GAUTHERET 1955; SYONO 1965a; YAMAGUCHI und NAKAYIMA 1966) und aus anderen Angiospermen (z.B. MILLER und SKOOG 1953; GAUTHERET 1959; TORREY 1959; HAYASHI 1961; MURASHIGE und NAKANO 1964; BABRA und NICKELL 1969) anfangs Sprosse oder Wurzeln bildeten, später jedoch ausschließlich als ungeordnete Kallusmasse wuchsen. Bedingt durch unterschiedliche Kulturmethoden und genetische Variabilität schwanken die Anga-

ben in bezug auf den Zeitraum der Organbildung für Kulturen aus verschiedenen Arten oder auch aus derselben Art. Von einigen Ausnahmen abgesehen, bei denen längere Zeit nach dem Verlust der Regenerationsfähigkeit unkontrolliert, d.h. spontan noch einmal Sprosse oder Wurzeln entstanden (vgl. GAUTHERET 1959, S. 338), ist es bisher in keinem Fall gelungen, die Kulturen gezielt wieder umzustimmen. Infolgedessen bestand bis jetzt auch keine Klarheit darüber, ob der Verlust der Regenerationsfähigkeit auf einer reversiblen Änderung bestimmter Kompetenzen der Kalluszellen beruht, oder ob regelmäßig nach einiger Zeit *in vitro* irreversibel die Totipotenz der Zellen verlorengeht (vgl. MURASHIGE und NAKANO 1965; HALPERIN 1969).

In den eigenen Untersuchungen hat es sich jetzt gezeigt, daß Karottenkulturen durch eine einfache Manipulation des Nährmediums die Regenerationsfähigkeit voll zurückgewinnen können. Durch Auxinentzug, der unter anderen Bedingungen eine erstmalige Induktion von Sprossen oder Wurzeln (LEVINE 1950; PILET 1961) bzw. von Embryonen (REINERT 1959; HALPERIN und WETHERELL 1964) bewirkt, gelang es im vorliegenden Fall eine scheinbar endgültig eingestellte Aktivität erneut zu beleben. Die erfolgreiche Wiederinduktion von Embryonen in älteren M_5 -Kulturen ist ein deutlicher Beweis dafür, daß Kulturen, die unter bestimmten Bedingungen keine Regenerate bilden, nicht unbedingt ihre Totipotenz eingebüßt haben müssen. Im vorliegenden Fall war lediglich die Kompetenz für bestimmte Differenzierungsschritte allmählich gehemmt worden.

Entscheidend für dieses Verhalten ist offenbar der unterschiedliche Auxinbedarf von frisch isolierten und länger kultivierten Zellen. Zur Kallusinduktion an Explantaten ist Auxin in der Regel unbedingt erforderlich (z.B. GAUTHERET 1942; MOREL 1948; SKOOG und MILLER 1957; PARIS 1958), später können die Kalluszellen in vielen

Fällen auch auxinautotroph wachsen (BRAUN und MOREL 1950; HENDERSON 1954) sowie gleichzeitig die Fähigkeit zur Organbildung verlieren (MOREL 1948; GAUTHERET 1959, S. 337). Eine solche Habituation (Auxinautotrophie) zeigte sich auch hier an einigen Karottenkulturen, die teilweise 80 Wochen nach dem Auxinentzug noch gut wuchsen (vgl. Abb. 5b). Es erscheint also nicht ausgeschlossen, daß durch Synthese nativer Auxine oder auch durch Akkumulation von 2,4-D in den Zellen (GAMBORG und LA RUE 1968) der allgemeine Auxinspiegel steigt, wodurch sich eine reversible Hemmung der Regeneratbildung erklären ließe.

Der Auxinentzug bei älteren M_S -Kulturen hat noch eine weitere interessante Tatsache ergeben, die darauf schließen läßt, daß das Auxin nicht nur im Laufe der Kulturzeit die Organbildung völlig hemmt, sondern bereits auch in den jüngeren Kulturen selektiv bestimmte Kompetenzen unterdrückt. Denn außer dem Wiedergewinn der Fähigkeit zur Embryobildung erlangen die Kulturen auf " M_S minus 2,4-D" erstmals auch die Kompetenz Wurzeln zu bilden. In den jungen M_S -Kulturen wird demnach durch synergistische Wirkung von Auxin mit dem hohen Gehalt an anorganischen Stickstoffverbindungen (60 mMol) nicht nur die Embryobildung ermöglicht (REINERT, BACKS und KROSING 1966; REINERT 1967a), sondern gleichzeitig wird offensichtlich die Wurzelbildung gehemmt. Umgekehrt gilt das auch für M_W -Kulturen, an denen Auxin bei geringem Stickstoffgehalt (3,2 mMol) die Embryobildung unterdrückt und stattdessen die Entstehung von Wurzeln zuläßt. In beiden Fällen werden durch den Entzug des Auxins die hemmenden Wirkungen aufgehoben, d.h. nicht nur bei hohem Stickstoffgehalt (" M_S minus 2,4-D"), sondern nach neueren Ergebnissen auch bei niedrigem Stickstoffgehalt (" M_W minus 2,4-D") (REINERT und TAZAWA 1969; ZERBAN Staatsexamensarbeit 1970; REINERT, BACKS-HÜSEMANN und ZERBAN 1970) treten Embryonen und Wurzeln gemeinsam nebeneinander in den Kulturen auf.

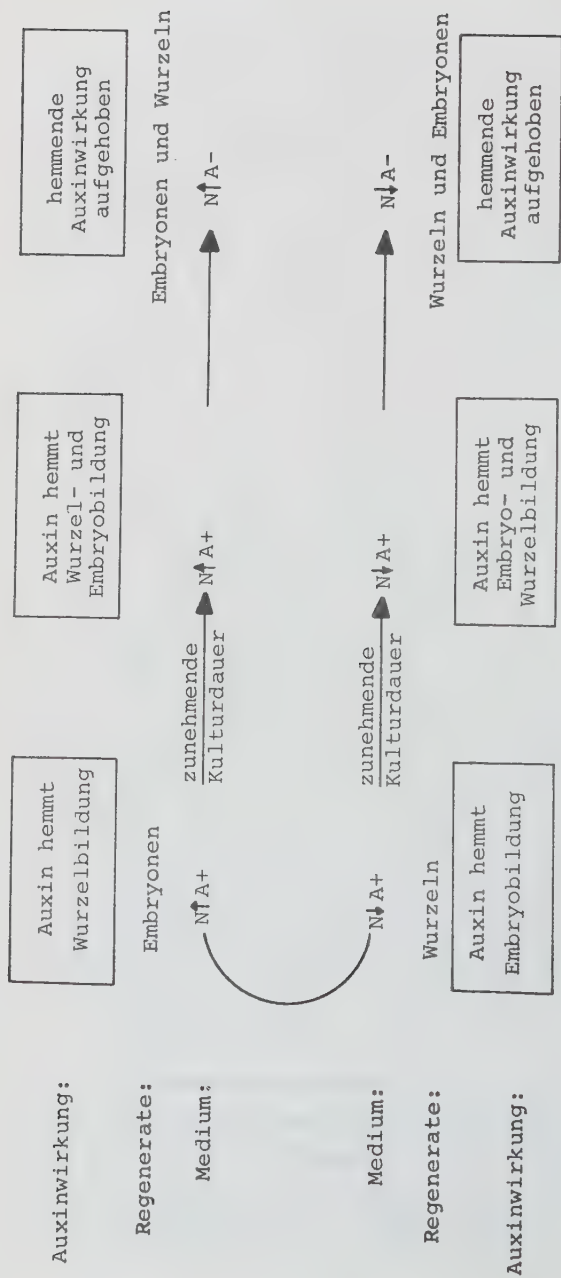


Abb. 14 Möglichkeiten zur Steuerung der Kompetenzen zur Wurzel- und Embryobildung durch exogenes Auxin und den Stickstoffgehalt des Nährmediums.

$N \downarrow$ niedriger Stickstoffgehalt (3,2 mMol); $A +$ auxinhaltig ($2,4-D \ 5 \times 10^{-8} \text{ g/ml}$);
 $N \uparrow$ hoher Stickstoffgehalt (60 mMol); $A -$ Auxinentzug.

In das gleiche Bild fügt sich auch das Verhalten der Kulturen nach dem Umsetzen von " M_W " auf " M_S ". Hier wechseln die morphogenetischen Kompetenzen in Gegenwart von Auxin, was im wesentlichen durch die Erhöhung des Stickstoffspiegels im Medium bedingt ist (REINERT, BACKS und KROSING 1966; REINERT, TAZAWA und SEMENOFF 1967). Statt der Wurzeln entstehen jetzt Embryonen. Die älteren M_W -Kulturen reagieren ähnlich wie frisch isolierte Explantate auf " M_S ". Der zeitliche Verlauf der Embryobildung gleicht dem "Normalverlauf", d.h. nach einiger Zeit erlischt auch hier die Fähigkeit zur Embryobildung. Durch Auxinentzug können daraufhin beide Kompetenzen erneut freigesetzt werden (vgl. Abb.5c).

Durch diese Ergebnisse zeigt sich klar, daß der Kallus - ebenso wie die Zellen in der intakten Pflanze - nicht endgültig auf eine bestimmte Entwicklungsrichtung festgelegt ist, die Kompetenzen der Zellen sind vielmehr durch geeignete Außenfaktoren manipulierbar. Die verschiedenen Möglichkeiten zur Steuerung der Embryo- und Wurzelbildung sind in Abb. 14 zu einem Schema zusammengefaßt. Durch bestimmte Kombination dieser Möglichkeiten können die morphogenetischen Fähigkeiten außerdem über längere Kulturperioden erhalten bleiben. Das gilt allerdings einerseits nur für den untersuchten Zeitraum von 220 Wochen, andererseits zeigt sich innerhalb dieser Zeit an den Kulturen allmählich ein Nachlassen der Reaktionsfähigkeit auf die beschriebenen Veränderungen der Nährmedien. Zuerst verlieren M_S -Kulturen die Fähigkeit nach Auxinentzug nochmals Embryonen zu bilden. Im Alter von einem Jahr reagieren noch sämtliche Kulturen darauf, spätestens nach 140 Wochen der Subkultur auf " M_S " ist es hier nicht mehr möglich, durch Auxinentzug Embryobildung hervorzurufen. Länger erhalten bleibt dagegen die Reaktionsfähigkeit der M_W -Kulturen. Hier können durch Erhöhung des Stickstoffgehalts im Nährmedium (Umsetzen von " M_W " auf

"M_S") in mehreren Fällen noch am Anfang des 5. Jahres Embryonen entstehen bzw. zu einem noch späteren Zeitpunkt durch Auxinentzug.

Offenbar besteht ein enger Zusammenhang zwischen der Dauer der Regenerationsfähigkeit und der Wachstumsgeschwindigkeit der Kulturen auf den verschiedenen Medien. Durchschnittlich haben M_S-Kulturen pro Übertragungsperiode den fünffachen Zuwachs, den M_W-Kulturen in der gleichen Zeit erreichen (REINERT 1967b; REINERT und BACKS 1968). Geringeres Wachstum ist zwangsläufig auch verbunden mit einer geringeren Häufigkeit der Zellteilungen. Verhielte sich die Dauer der Regenerationsfähigkeit umgekehrt proportional der Wachstumsgeschwindigkeit bzw. der Anzahl der Zellgenerationen, die durchlaufen werden, so müßten sich zu bestimmten Zeiten Parallelen im Verhalten dieser Kulturen zeigen. Unter Berücksichtigung der Wachstumsgeschwindigkeit hätten demnach M_S-Kulturen z.B. im Alter von 38 Wochen das gleiche physiologische Alter, wie die M_W-Kulturen nach 190 Wochen. Vergleicht man zu diesen Zeiten die Fähigkeiten zur Embryobildung, so verhalten sich die Kulturen in der Tat sehr ähnlich. Von sämtlichen untersuchten Stammkulturen auf "M_S" sind im Alter von 38 Wochen noch 40% in der Lage, Embryonen zu bilden; von den M_W-Kulturen reagieren im Alter von 190 Wochen ebenfalls noch 40% der Stämme (vgl. Abb. 8). Legt man für die längste Dauer der Embryobildung auf "M_S" den Ausnahmefall von 72 Wochen zugrunde (Abb. 2f), so wäre für M_W-Kulturen eine fünffache Dauer von maximal 360 Wochen (ca. 7 Jahre) zu erwarten für die Kompetenz nach Stickstofferrhöhung in Gegenwart von Auxin Embryonen zu bilden.

Im Einzelfall hat diese Berechnung allerdings keine absolute Gültigkeit. Das zeigt z.B. ein Vergleich von zwei parallel isolierten Stämmen der LF, die sich in ihrem

Verhalten auf "M_S" kaum unterscheiden, d.h. bei Stamm (a) erlischt die Fähigkeit zur Embryobildung nach 36 Wochen, bei Stamm (b) nach 32 Wochen. Hinsichtlich der Embryobildung nach Umsetzen der Schwesterstämme von "M_W" auf "M_S" ergeben sich aber starke Abweichungen. Stamm (a) stellt die Embryobildung verhältnismäßig früh (nach 112 Wochen) ein, während Stamm (b) noch im Alter von 136 Wochen 100%ig reagiert (vgl. Abb. 7).

In der ausgeprägten Variabilität zwischen den Stammkulturen verschiedener Herkunft liegt eine große Schwierigkeit für genaue Berechnungen, so daß die Angaben nur pauschal für eine größere Anzahl von Stämmen bzw. Kulturen zutreffen. Es ist also nicht ausgeschlossen, daß in Abhängigkeit von der Anzahl der zurückgelegten Zellgenerationen regelmäßig bestimmte endogene Veränderungen in den Zellen eintreten, die unter den jeweiligen Bedingungen die Organbildung allmählich ausschließen. Über Art und Ursachen dieser Veränderungen, die den Kern oder das Cytoplasma betreffen können, bestehen bisher nur Vermutungen.

GAUTHERET (1966) erklärt das Nachlassen morphogener Aktivität "as being due to the exhaustion of a specific factor contained in the primitive explant which is no longer synthesized in vitro". Gegen diese Hypothese spricht die verhältnismäßig lange Dauer der Regenerationsfähigkeit (bis zu mehreren Jahren). Außerdem ließ sich die Fähigkeit Embryonen zu bilden innerhalb bestimmter Zeit zurückgewinnen. Erreicht wurde das jedoch nicht durch Ersatz bzw. Zugabe eines spezifischen "organogenetic hormone" sondern durch Entzug des hemmenden Wuchsstoffes (vgl. "M_S minus 2,4-D").

Hinweise darauf, daß die Synthesefähigkeiten selbst sich ändern können, haben neuere Untersuchungen an den

Karottenkulturen ergeben (REINERT und TAZAWA 1969). Danach enthalten Kulturen, die nicht mehr regenerieren im Vergleich zu jungem Kallus auffallend wenig löslichen und gebundenen Stickstoff, trotz gleichbleibender NH_4^+ -Konzentration in den Zellen. Die Autoren schließen daraus, daß der Verlust der Fähigkeit zur Morphogenese einen ursächlichen Zusammenhang haben könnte mit einer abnehmenden Fähigkeit des Gewebes Aminosäuren bzw. Proteine zu synthetisieren. Aufgrund sich ändernder Reaktionen auf Purinderivate und verschiedene Hemmstoffe (SYONO 1965 b) sowie auf einige Aminosäuren (REINERT und TAZAWA 1969), werden neben drastischen Veränderungen des Stoffwechsels Änderungen der Permeabilitätsverhältnisse der Zellen mit zunehmender Kulturdauer vermutet.

Als Ursache für biochemische und physikalische Veränderungen der Zellen, die einen Verlust der Fähigkeit zur Organbildung bedingen könnten, werden Umwandlungen im Chromosomenbestand der Zellen angesehen. Steigender Ploidiegrad und Anhäufung der polyploiden Zellen, die in der Regel bis auf Ausnahmen (Kalluszellen aus *Helianthus annuus*: PARTANEN 1963; *Medicago sativa*: CLEMENT 1964; *Crepis capillaris*: REINERT und KÜSTER 1966; *Eucalyptus*: PITON 1966) schon nach wenigen Passagen in sämtlichen untersuchten Gewebekulturen auftreten (z.B. MELCHERS und BERGMANN 1959; PARTANEN 1963; TORREY 1967; MURASHIGE, NAKANO und TUCKER 1967) schienen als Erklärung für den regelmäßigen Verlust der Regenerationsfähigkeit einleuchtend. Aber seitdem in Regeneraten aus Kalluskulturen nicht nur diploide (GAUTHERET 1966), sondern auch polyploide Meristeme (MURASHIGE und NAKANO 1966; TORREY 1967) nachgewiesen wurden, besteht kein Grund zu der Schlußfolgerung "only cells with 2 n chromosomes can give rise to vegetative points" (GAUTHERET 1966).

Mit zunehmendem Grad der Endopolyploidisierung können durch Zerfall der Kerne in unregelmäßige Teilkerne auch

aneuploide Zellen in den Kulturen entstehen (TORREY 1959; HALPERIN 1966b; TORREY 1967; MURASHIGE und NAKANO 1967), die sich trotzdem intensiv weiterteilen (DE TOROK und RODERICK 1962) und sich so ebenfalls in den Kulturen anreichern. Die Annahme, daß Aneuploidie die Regenerationsfähigkeit ausschlieÙe (z.B. MUIR 1965) hat sich ebenfalls nicht uneingeschränkt bestätigt. Das zeigt eindeutig die Bildung von ganzen Pflänzchen an turmorösen, 16 bzw. 20 Jahre alten Tabakkulturen, deren Chromosomensätze weit von der Norm abwichen (LUTZ 1966; SACRISTAN und MELCHERS 1969).

Im umgekehrten Fall kann ein gradueller Verlust der Regenerationsfähigkeit ebenfalls eintreten ohne gleichzeitige Veränderung im Chromosomenbestand, d.h. auch Kulturen, die über längere Zeit diploid bleiben, stellen die Organbildung ein (REINERT und KÜSTER 1966; NAG und JOHRI 1969).

Aufgrund dieser Befunde und der Tatsache, daß kürzlich an Karottenkulturen noch im Alter von 12 Jahren Embryonen induziert werden konnten (SUSSEX und FREI 1968), liegt es nahe, daß bei einem Erlöschen der Regenerationsfähigkeit "die Kulturbedingungen und andere nicht-genetische Faktoren die Manifestierung genetischer Information verhindern" (REINERT 1968). Es ist also nicht ausgeschlossen, daß der Verlust der Fähigkeit zur Organbildung auch bei sehr alten Kulturen generell unter noch zu definierenden Bedingungen reversibel ist.

Der vorangegangene Teil beschreibt und diskutiert Möglichkeiten zur Steuerung der Morphogenese in Kalluskulturen,

wobei die Heterogenität dieser Zellpopulationen (vgl. PARTANEN 1963) unberücksichtigt bleibt. Eindeutige Aussagen über die Ontogenese sowie Angaben über den Charakter und die Anzahl der Zellen, die sich zu Organen differenzieren, sind dabei nicht möglich. Darum wurde hier außerdem ein Untersuchungssystem erarbeitet, mit dessen Hilfe entsprechende Versuche auch an isolierten Einzelzellen direkt durchgeführt werden können. Die dabei verwendete Plattentechnik (BERGMANN 1960; REINERT und v. ARDENNE 1964) gestattet - ähnlich mikrobiologischen Methoden - eine große Anzahl von Einzelzellen einfach zu handhaben und zu beobachten.

Obwohl schon seit 1902 angestrebt (HABERLANDT), ist es bisher erst in wenigen Fällen gelungen, Einzelzellen - die nicht aus Tumoren stammen - auf einem vollsynthetischen Medium zu kultivieren (Haplopappus: REINERT 1963; Convolvulus: EARLE und TORREY 1965; CHUPEAU 1968; Pelargonium: CHEN und GALSTON 1965; Karotten: BACKS 1967; Calystegia: ROSSINI 1969; Tabak: USUI und TAEBE 1969). In den älteren Versuchen (bis 1965) sind nur wenige Einzelzellen zur Teilung angeregt worden, Koloniebildung gehörte noch zu den Ausnahmen. Bei den Karottenzellen hängt die Teilungsrate (plating efficiency) vom verwendeten Medium ab. So erreichen z.B. Einzelzellen aus dem Kallus der LF auf "M_W" eine durchschnittliche Teilungsrate von nur 27%, während unter vergleichbaren Bedingungen das Medium nach MURASHIGE und SKOOG (1962) in der hier modifizierten Form Teilungen in 90 bis 100% der beobachteten Einzelzellen ermöglicht (BACKS 1967).

Das konstante Teilungswachstum der Einzelzellen ist aber nur dann möglich, wenn gleichzeitig Kallusstückchen in derselben Petrischale wachsen (s. Methode). Der Einfluß benachbart wachsender Gewebe auf das Teilungswachstum isolierter Zellen ist quantitativ zuerst an Einzelzellen aus crown-gall Kulturen von *Vitis vinifera* untersucht

worden (REINERT und v.ARDENNE 1964). Dabei hatte sich eine direkte Abhängigkeit der Anzahl der Teilungen vom Ausgangsgewicht des Beimpfungsgewebes ergeben. Da in diesen Versuchen Tumorzellen benutzt wurden, stand eine entsprechende Untersuchung für Einzelzellen aus "normalem" Kallus noch aus.

Die eigenen Ergebnisse über das Wachstum von Einzelzellen aus Karottenkallus ergaben eine grundsätzliche Übereinstimmung mit den Beobachtungen an Tumorzellen. In beiden Fällen war ein gleichmäßiges Teilungswachstum der isolierten Einzelzellen nur in Gegenwart einer bestimmten - dem Volumen und der Oberflächengröße des Nähragars angepaßten - Gewebemenge möglich. Bei der hier verwendeten Versuchsanordnung ergab sich ein optimales Beimpfungsgewicht von 200 bis 400 mg für hohe Teilungsraten.

Danach stellt sich nun die Frage, worin der Einfluß der Nachbargewebe auf das Überleben und das Teilungswachstum der Einzelzellen besteht. Isolierte Zellen verlieren wahrscheinlich wichtige Substanzen in das frische Nährmedium (WENT 1954). Anhaltspunkte dafür haben zuerst Untersuchungen an tierischen Zellen ergeben. Isolierte Säugetierzellen sind z.B. in der Lage, bestimmte Aminosäuren zu synthetisieren; fällt die Dichte der Zellpopulation aber unter eine bestimmte Größe ab, so gehen diese Stoffwechselprodukte an das Nährmedium verloren. Die Konzentrationen innerhalb der Zellen reichen dann nicht mehr aus, die Teilungen zu ermöglichen (EAGLE und PIEZ 1962). Bei genügend kleinem Volumen des Nährsubstrats bleiben die Stoffe offenbar auch für eine einzelne, isoliert liegende Zelle in ausreichender Konzentration erhalten. Das hat sich an Einzelzellen aus Tabakkallus gezeigt, die ohne die Gegenwart von Nachbarzellen in Mikrokulturen zu Kolonien heranwuchsen (VASIL, HILDEBRANDT und RIKER 1964). Leider enthielt das Medium Kokosnußmilch als komplexen, nicht genau definierten Bestandteil, so daß eine eindeu-

tige Beurteilung in diesem Fall nicht möglich ist.

Bei geringem Beimpfungsgewicht und großem Nährboden-
volumen können sich die Einzelzellen nur dann teilen,
wenn das Medium vorher "konditioniert" ist (vgl. REINERT
und v.ARDENNE 1964). Die Konditionierungsfaktoren, d.h.
Stoffe, die von einem früher auf diesem Medium kultivier-
ten Gewebe stammen, erweisen sich als relativ thermo-
stabil, sie sind auch noch wirksam, nachdem der Nähragar
im siedenden Wasserbad aufgeschmolzen wurde. Es ist aller-
dings nicht auszuschließen, daß sie beim Erhitzen doch
teilweise zerstört werden, denn die konditionierten Nähr-
böden sind weniger wirksam, als hohe Beimpfungsmengen
bzw. dichte Einsaat der Zellen.

Über die chemische Natur der Konditionierungsfaktoren
ist bis heute wenig bekannt. Obwohl an verschiedenen Kal-
luskulturen festgestellt wurde, daß Substanzen - besonders
Enzyme, Polysaccharide und Wachstumsstoffe - an die Nährmedien
abgegeben werden (Zusammenfassung bis 1965: STREET, HENSHAW
und BUIATTI 1965; CONSTABEL und KIRSTEN 1965; OLSON et al.
1969; MACKENZIE und STREET 1970), liegen bisher nur wenige
Untersuchungen darüber vor, welche dieser Verbindungen auf
die Teilung von Einzelzellen stimulierend wirken. Nach Er-
gebnissen mit Convolvuluszellen kämen Vitamine, Aminosäu-
ren und vor allem Kinine in Frage (EARLE und TORREY 1965a).
Kinetin war z.B. zur Teilung isolierter "units" (d.s. Ein-
zelzellen und mehrzellige Gruppen) erforderlich, während
Convolvulus-Kallus auch ohne Kinetin wachsen konnte. Die
Autoren schließen daraus, daß möglicherweise Kinine von
den Zellen in das umgebende Medium abgegeben werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Konditionierungs-
faktoren nicht weiter untersucht, weil das Hauptinteresse
der Morphogenese der Einzelzellen galt. Es sei hier nur
darauf hingewiesen, daß Einzelzellen aus Karottenkallus
aufgrund ihrer hohen Teilungsraten auf dem synthetischen



Abb.15

Unterschiedliche embryonale Entwicklungsstadien

(A = globulär, B und D = herzförmig, C = torpedoförmig) aus Gewebekulturen von *Daucus carota*. Die Abbildung C stammt aus REINERT (1968). Für die photographische Aufnahme wurde der Kallus in Nährlösung aufgeschwemmt.

Medium sehr gut geeignet sind, das Problem der Konditionierung näher zu untersuchen.

Im letzten Teil der vorliegenden Untersuchung ist es zum ersten Mal gelungen, durch direkte mikroskopische Beobachtung sukzessive den Verlauf der Embryobildung durch isolierte Einzelzellen aus Karottenkulturen zu verfolgen. Damit steht jetzt auch das Material zur Verfügung, das für die Klärung weiterer wesentlicher Fragen der Embryogenese notwendig ist (KATO 1968; REINERT 1968; HALPERIN 1969). Voraussetzung für die erfolgreiche Durchführung der Versuche war neben dem schon erwähnten induktiven Medium (REINERT, BACKS und KROSING 1966) die Kenntnis über die Variabilität der Fähigkeit der Kalluskulturen zur Embryogenese im Verlauf einer längeren Kultur (vgl. Kap. I/1).

Nach allem, was bisher über die Embryogenese in vitro bekannt ist, bestehen keine unterschiedlichen Auffassungen über die Entwicklung von globulären Stadien bis zum Embryo (s. Abb. 15). Es war deshalb sinnvoll, die mikroskopische Untersuchung hauptsächlich auf die ersten Schritte der Embryobildung zu richten. Diese beginnt mit der Reembryonalisierung der vakuolisierten, parenchymatischen Einzelzellen durch wiederholte Teilung unter fortlaufender Verringerung der Zellgröße. Sie wird in der Regel durch eine inäquale Teilung eingeleitet. Dadurch entsteht zunächst neben vakuolisierten Zellen ein Komplex aus embryonalen Zellen, der im Verlauf des weiteren Wachstums unter Ausbildung einer Polaritätsachse zum Embryo wird. Am Wurzelpol des Embryos bleibt ein Rest des Proembryos erhalten, der teils aus embryonalen, teils aus parenchymatischen Zellen besteht und im Sinne der von HACCIOUS (1965) erneut vorgeschlagenen Definition SCHNARF's (1929) als Suspensor angesehen werden könnte. Aus den embryonalen Zellen des "Suspendors" können sich ebenfalls typische globuläre Embryostadien bilden, so daß bezogen

auf die isolierte Einzelzelle nicht nur ein einzelner, sondern mehrere Embryonen daraus entstehen.

Der hier beobachtete Entwicklungsgang entspricht also nicht bis in alle Einzelheiten der normalen Embryogenese von *Daucus carota* (vgl. BORTHWICK 1931). Eine derartige Entwicklung, die entsprechend dem regelmäßigen Teilungsmuster einer befruchteten Eizelle zunächst zu fädigen Embryostadien führen müßte (STEWART 1963), scheint zumindest nicht für isolierte Einzelzellen zu gelten. HOMES und GUILLAUME (1967), sowie NAKAYIMA und YAMAGUCHI (1967) haben aufgrund von Beobachtungen an Suspensions- bzw. Kalluskulturen von Karotten ebenfalls schon darauf hingewiesen, daß offenbar in vitro nicht alle embryonalen Entwicklungsstadien realisiert werden. Es ist allerdings noch eine offene Frage, ob das generell gilt, denn wegen der unterschiedlichen experimentellen Bedingungen können die meisten Ergebnisse nicht direkt miteinander verglichen werden.

Unter den hier beschriebenen Bedingungen müssen isolierte Einzelzellen zuerst einen Komplex aus kleinen plasmareichen Zellen bilden, ehe sie zur gerichteten Embryobildung übergehen können. Diese Art der Entwicklung entspricht derjenigen, die für die Fumariaceen beschrieben worden ist (SOUÈGES 1946); sie ist schon früher aufgrund der Ergebnisse von histologischen Untersuchungen an Kulturen aus Karotten als eine von verschiedenen Möglichkeiten diskutiert worden (REINERT 1958).

Die vorliegenden Ergebnisse decken sich ferner mit der Auffassung von HACCIOUS (1965) zur Embryogenese in vitro. Ausgehend von Beobachtungen über die normale Embryogenese in Samen verschiedener Familien postuliert sie, daß Adventivembryonen sich erst nach vorausgehender Bildung eines mehr oder weniger ausgedehnten proembryonalen Zell-

komplexes entwickeln, auch dann, wenn der dazugehörige zygotische Embryo eine sogenannte normale Embryogenese mit fadenförmigem Suspensor aufweist.

Eine weitere Frage, die sich aus den eigenen Beobachtungen ergibt und kurz erwähnt werden muß, betrifft die Funktion des Zellkomplexes, durch dessen Bildung aus der isolierten Einzelzelle erst die Voraussetzung für die Embryogenese in vitro geschaffen wird. Es wird zu klären sein, ob diese Zellen z.B. nur für die Entstehung der Polaritätsachse des Embryos wesentlich sind, oder ob sie über die Produktion und Lieferung bestimmter Stoffwechselprodukte die Bildung des Embryos ermöglichen. Es wäre aber auch nicht überraschend, wenn es sich bei entsprechenden Untersuchungen herausstellte, daß die aus der isolierten Einzelzelle neugebildeten Zellen über mehr als nur einen Faktor wirksam werden.

ZUSAMMENFASSUNG

Mit den vorliegenden Resultaten über die Regenerationsfähigkeit von Kalluskulturen und Einzelzellen aus *Daucus carota* ergeben sich neue Gesichtspunkte zu Fragen der Totipotenz somatischer Zellen *in vitro*.

Auf "M_S" - einer modifizierten Form des Mediums nach MURASHIGE und SKOOG (1962) - beginnt die Embryobildung an Explantaten aus der Karottenwurzel durchschnittlich 8 ± 2 Wochen nach der Isolierung, erreicht nach 16 bis 20 Wochen ein Maximum (bis 100%) und endet 38 ± 7 Wochen (in Ausnahmen 76 Wochen) nach Kulturbeginn.

Auf "M_W" - Nährlösung nach WHITE (1954) - entstehen an Explantaten gleichen Ursprungs frühestens nach 20 Wochen Wurzeln als einzige Regeneration. Nach unregelmäßigem Verlauf kann die Wurzelbildung nach zweijähriger Kulturzeit enden oder noch am Anfang des 5. Jahres andauern.

Durch einfache Veränderungen der Nährmedien, die den Stickstoff- und Auxingehalt betreffen, lassen sich die morphogenetischen Kompetenzen innerhalb bestimmter Grenzen beliebig steuern und nach dem Verlust der Regenerationsfähigkeit erneut induzieren. Dabei zeigt sich mit zunehmendem Alter eine abnehmende Tendenz zur Embryogenese. Während bis zum Alter von 92 Wochen an sämtlichen M_W-Kulturen durch Umsetzen auf "M_S" (Erhöhung des Stickstoffgehalts) statt der Wurzeln Embryonen induziert werden können, reagieren am Anfang des 5. Jahres nur noch 40% der Kulturen.

Der Entzug des Auxins aus "M_S" bewirkt die erneute Induktion von Embryonen in älteren Kulturen, die die Embryobildung bereits eingestellt hatten. Gleichzeitig werden an diesen Kulturen erstmals Wurzeln induziert. Die Wiederinduktion von Embryonen war bei einjährigen Kulturen voll wirksam, längstens aber bis zum Alter von 140 Wochen möglich.

Unwirksam in bezug auf eine Umstimmung zweijähriger Kulturen zur erneuten Organbildung waren Erhöhungen der Stickstoffkonzentrationen in "M_S" sowie Zusätze der Purinderivate Kinetin und Adeninsulfat.

Isolierte Einzelzellen aus Karottenkallus, die auf M₅-Medium in Petrischalen wuchsen, erreichten Teilungsraten von 93 bis 100% unter der Voraussetzung, daß ein bestimmtes Verhältnis der Beimpfungsmenge zum Volumen des Nährbodens nicht unterschritten wurde. Diese Abhängigkeit des Teilungswachstums der Einzelzellen von benachbart wachsenden Geweben ist - ebenso wie bei Tumorzellen - auf thermostabile Substanzen zurückzuführen, die auch von den Karottenzellen in das umgebende Medium abgegeben werden. An den isolierten Einzelzellen konnte erstmalig der Verlauf der Embryogenese direkt, d.h. durch mikroskopische Beobachtung verfolgt werden. Die Embryobildung wurde in der Regel durch eine inäquale Teilung eingeleitet. Danach entstand durch kurzfristig aufeinanderfolgende Teilungen einer der Tochterzellen ein Komplex aus embryonalen und parenchymatischen Zellen, aus dem sich innerhalb von 4 Wochen Embryonen entwickelten. Die beobachtete Embryogenese verlief also indirekt, d.h. Voraussetzung für die Bildung von Embryonen war die Entstehung einer größeren Anzahl von embryonalen Zellen. Rund 30% der sich teilenden Zellen waren in der Lage, unter den gegebenen Versuchsbedingungen diese embryonalen Zellen zu bilden. Verschiedene Fragen, die sich aus diesen Ergebnissen für die Beurteilung von Hypothesen bzw. von anderen Resultaten ergeben werden diskutiert.

LITERATUR

- BABRA, R. and L.G. NICKELL - 1969: Nutrition and organ differentiation in tissue cultures of Sugarcane, a Monocotyledon. *Planta* (Berl.) 89, 229 - 302.
- BACKS, D. - 1967: Teilungswachstum isolierter Einzelzellen aus Gewebekulturen *Daucus carota* auf synthetischen Medien. Diplomarbeit FU Berlin.
- BALL, E. and P.C. JOSHI - 1965: Observations on individual cells of *Nicotiana tabacum*. *Bot. Gaz.* 126, 233 - 246.
- BERGMANN, L. - 1960: Growth and division of single cells of higher plants in vitro. *J. Gen. Physiol.* 43, 841 - 851.
- BLAKELY, L.M. - 1964: Growth and organized development of cultured cells. VI. The behavior of individual cells on nutrient agar. *Am. J. Bot.* 51, 792 - 807.
- BORTHWICK, H.A. - 1931: Development of the macrogametophyte and embryo of *Daucus carota*. *Bot. Gaz.* 92, 23-44.
- BRAUN, A.C. and G. MOREL - 1950: A comparison of normal and crown-gall tumor tissue implants in the European grape. *Am. J. Bot.* 37, 499 - 501.
- CHEN, H.R. and A.W. GALSTON - 1965: Growth and development of *Pelargonium* pith cells in vitro. I. Induction of cell division. *Physiol. Plantarum* 18, 454 - 461.
- CHYPEAU, Y. - 1968: Une méthode de culture de cellules végétales en boîte de Pétri. *Bull. Soc. Bot. Fr.* 115, 469 - 478.
- CONSTABEL, F.R. und KIRSTEN, G. - 1965: Substratveränderungen durch pflanzliche Gewebekulturen. *Ber. dtsh. Bot. Ges.* 78, (38) - (43).
- DE TOROK, D. and T.H. RODERICK - 1962: Association between growth rate, mitotic frequency and chromosome number in a plant tissue culture. *Cancer Res.* 22, 174 - 181.
- EAGLE, H. and K. PIEZ - 1962: The population-dependent requirements by cultured mammalian cells for metabolites which they can synthesize. *J. exp. Med.* 116, 29 - 43.

- EARLE, D.E. and J.G.TORREY - 1965 a: Colony formation by isolated *Convolvulus* cells plated on defined media *Plant Physiol.* 40, 320-328.
- EARLE, D.E. and J.G.TORREY - 1965 b: Morphogenesis in cell colonies from *Convolvulus* cell suspensions plated on synthetic media. *Am. J. Bot.* 52, 891 - 899.
- GAMBORG, O.L. and T.A.G. LA RUE - 1968: Ethylene produced by plant cells in suspension cultures. *Nature* 220, 604 - 605.
- GAUTHERET, R.J. - 1942: Hétéro-auxines et cultures de tissus végétaux. *Bull. Soc. Chim.Biol.* 24, 13 - 41.
- GAUTHERET, R.J. - 1945: Une voie nouvelle en biologie végétale: La culture des tissus. Gallimard ed. Paris, p. 202.
- GAUTHERET, R.J. - 1955: Sur la variabilité des propriétés physiologiques des cultures des tissus végétaux. *Rev.Gén. Bot.* 62, 5 - 112.
- GAUTHERET, R.J. - 1959: La culture des tissus végétaux. Masson et Cie., Paris.
- GAUTHERET, R.J. - 1966: Factors affecting differentiation of plant tissues grown in vitro. In: Cell differentiation and morphogenesis. North Holland Pub. Comp., 55 - 95.
- HABERLANDT, G. - 1902: Culturversuche mit isolierten Pflanzenzellen. *S. B. Akad. Wiss. Wien, Math.-Nat. Cl.* 111, 69 - 92.
- HACCIUS, B. - 1965: Haben "Gewebekulturen-Embryonen" einen Suspensor? *Ber. dtsh. Bot. Ges.* 78, (11)-(21).
- HALPERIN, W. - 1966 a: Single cells, coconut milk, and embryogenesis in vitro. *Science* 153, 1287-1288.
- HALPERIN, W. - 1966 b: Alternative morphogenetic events in cell suspensions. *Am. J. Bot.* 53, 443-453.
- HALPERIN, W. - 1969: Morphogenesis in cell cultures. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 20, 395 - 418.

- HALPERIN, W. and D.F. WETHERELL - 1964: Adventive embryony in tissue cultures of the wild carrot *Daucus carota*. *Am. J. Bot.* 51, 274 - 283.
- HALPERIN, W. and D.F. WETHERELL - 1965: Ontogeny of adventive embryos in carrot cell cultures. 147, 756 - 758.
- HALPERIN, W. and W.A. JENSEN - 1967: Changes during growth and embryogenesis in carrot cell cultures. *Ultrastruct. Res.* 18, 428 - 443.
- HAYASHI, T. - 1961: Culture of sunflower crown-gall tissue and its differentiation. *Sci. Pap. Coll. Gen. Educ., Univ. Tokyo* 11, 225-230.
- HENDERSON, J.H.M. - 1954: The changing nutritional pattern from normal to habituated Sunflower callus tissue in vitro. *Ann. Biol.* 30, 329 - 348.
- HOMÈS, J.L.A. et M. GUILLAUME - 1967: Phénomène d'organogénèse dans les cultures in vitro de tissus de carotte (*Daucus carota* L.). *Bull. Soc. Belg.* 100, 239 - 258.
- KATO, H. - 1968: The serial observations of the adventive embryogenesis in the microculture of carrot tissue. *Sci. Pap. Cell. Gen. Educ., Univ. Tokyo* 18, 191 - 197.
- KATO, H. and M. TAKEUCHI - 1963: Morphogenesis in vitro starting from single cells of carrot root. *Plant and Cell Physiol.* 4, 243 - 245.
- KONAR, R.N. and K. NATARAJA - 1965: Experimental studies in *Ranunculus sceleratus* L. Plantlets from freely suspended cells and cell groups. *Phytomorphology* 15, 211 - 215.
- LEVINE, M. - 1950: The growth of normal plant tissue in vitro as affected by chemical carcinogens and plant growth substances. I. The culture of carrot tap-root meristem. *Am. J. Bot.* 37, 445 - 458.
- LUTZ, A. - 1966: Obtention de plantes de Tabac à partir de cultures unicellulaires provenant d'une souche anergiée. *C.R. Acad.Sci.* 262, 1856 - 1858.

- MACKENZIE, I.A. and H.E. STREET - 1970: Studies on the growth in culture of plant cells. VIII. The production of ethylene by suspension cultures of *Acer pseudoplatanus* L. J. exp. Bot. 21, 824 - 825.
- MELCHERS, G. und L. BERGMANN - 1959: Untersuchungen an Kulturen von haploiden Geweben von *Antirrhinum majus*. Ber. dtsh. Bot. Ges. 71, 459 - 473.
- MILLER, C.O. and F.SKOOG - 1953: Chemical control of bud formation in tobacco stem segments. Am. J. Bot. 40, 768 - 773.
- MOREL, G. - 1948: Recherches sur la culture associée de parasites obligatoires et de tissus végétaux. Ann. Epiphyt. N.S. 14, 123 - 234.
- MOREL, G. and R.H. WETMORE - 1951: Tissue culture of monocotyledons. Am. J. Bot. 38, 138 - 140.
- MUIR, W.H. - 1965: Influence of variation in chromosome number of differentiation in plant tissue cultures. In: WHITE, P.R. & A.R.GROVE (eds.) Proc. Int. Conf. Plant Tissue Culture. Berkeley Calif. 485 - 492.
- MURASHIGE, T. and R.NAKANO - 1964: Morphogenetic declines in tobacco tissue cultures. Am. J. Bot. 51, 670.
- MURASHIGE, T. and R. NAKANO - 1965: Morphogenetic behavior of tobacco tissue cultures and implication of plant senescence. Am. J. Bot. 52, 819-827.
- MURASHIGE, T. and R. NAKANO - 1966: Tissue cultures as a potential tool obtaining polyploid plants. J. Heredity 57, 115-118.
- MURASHIGE, T. and R. NAKANO - 1967: Chromosome complement as a determinant of the morphogenetic potential of tobacco cells. Am. J. Bot. 54, 963 - 970.
- MURASHIGE, T. and R. NAKANO and D.P.H. TUCKER - 1967: Histogenesis and rate of nuclear change in *Citrus limon* tissue in vitro. Phytomorphology 17, 469 - 476.
- MURASHIGE, T. and F. SKOOG - 1962: A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Phyiol. Plantarum (Kbh.) 15, 473 - 497.

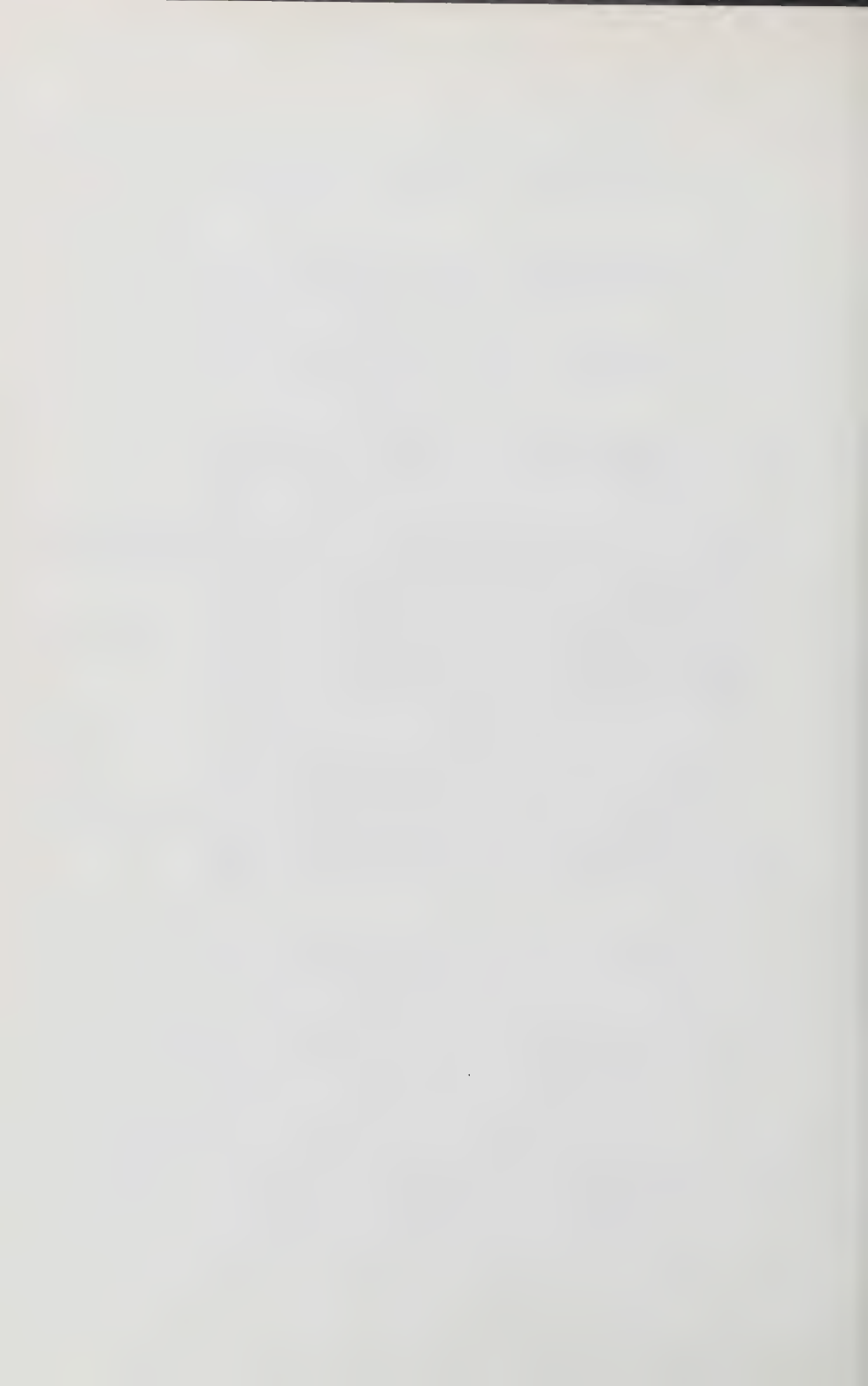
- NAG, K.K. and B.M. JOHRI - 1969: Organogenesis and chromosomal constitution in embryo callus of *Nuytsia floribunda*. *Phytomorphology* 19, 405 - 408.
- NAKAYIMA, T. and T. YAMAGUCHI - 1967: On the embryogenesis observed in tissue culture of carrot, *Daucus carota*. *Bull. Univ. Osaka Pref., ser. B* 19, 43 - 46.
- OLSON, C.A., J.J.EVANS, D.P. FREDERICK and E.F. JANSEN - 1969: Plant suspension culture media macromolecules - pectic substances, protein and peroxysasé. *Plant Physiol.* 44, 1594 - 1600.
- PÄTAU, K. - 1943: Zur statistischen Beurteilung von Messungsreihen. (Eine neue t-Tafel). *Biol. Zbl.* 63, 152 - 168.
- PARIS, D. - 1958: Recherches sur la nutrition des tissus normaux d'Aubépine cultivés in vitro. *C.R. Acad. Sci.* 246, 449 - 451.
- PARTANEN, C.R. - 1963: Plant tissue culture in relation to developmental cytology. *Intern. Rev. Cyt.* 15, 215 - 243.
- PILET, P.E. - 1961: Culture in vitro des tissus de Carotte et organogène. *Bull. Soc. Bot.Suisse* 71, 189 - 208.
- PITON, F. - 1969: Quelques observations cytologiques sur les tissus d'Eucalyptus camaldulensis cultivés in vitro. *Revue gén. Bot.* 76, 287 - 307.
- REINERT, J. - 1958: Untersuchungen über die Morphogenese an Gewebekulturen aus Karotten. *Ber. dtsh. Bot. Ges.* 71, 15.
- REINERT, J. - 1959: Über die Kontrolle der Morphogenese und die Induktion von Adventivembryonen an Gewebekulturen aus Karotten. *Planta (Berl.)* 53, 318 - 333.
- REINERT, J. - 1953: Growth of single cells from higher plants on synthetic media. *Nature* 200, 90-91.
- REINERT, J. - 1967a: Factors of embryo formation in plant tissues cultivated in vitro. In: *Colloques Nationaux du C.D.R.S. sur les cultures de tissus de plantes*. Strasbourg p. 33 - 40.

- REINERT, J. - 1967b: Some aspects of embryogenesis in somatic cells of *Daucus carota*. *Phytomorphology* 17, 510 - 516.
- REINERT, J. - 1968: Morphogenese in Gewebe- und Zellkulturen. *Naturwiss.* 55, 170 - 175.
- REINERT, J. und R.v.ARDENNE - 1964: Abhängigkeit des Teilungswachstums isolierter Einzelzellen aus *Vitis vinifera* Kulturen von benachbarten wachsenden Geweben. *Zt. Naturfg.* 19b, 1150 - 1156.
- REINERT, J. and D. BACKS - 1968: Control of totipotency in plant cells growing in vitro. *Nature* 220, 1340 - 1341.
- REINERT, J., BACKS, D. und M. KROSING - 1966: Faktoren der Embryogenese in Gewebekulturen aus Kulturformen von Umbelliferen. *Planta (Berl.)* 68, 375 - 378.
- REINERT, J., BACKS-HÜSEMANN, D. und H. ZERBAN - 1970: Determination of embryo and root formation in tissue cultures from *Daucus carota*. 2. Intern. Conf. Plant Tissue Culture, C.N.R.S. Strasbourg, (in press).
- REINERT, J. und H.-J. KÜSTER - 1966: Diploide chlorophyllhaltige Gewebekulturen aus Blättern von *Crepis capillaris* L. (Wallr). *Z.Pflanzenphysiol.* 54, 213 - 222.
- REINERT, J. und M. TAZAWA - 1969: Wirkungen von Stickstoffverbindungen und von Auxin auf die Embryogenese in Gewebekulturen. *Planta (Berl.)* 87, 239-248.
- REINERT, J., TAZAWA, M. and S. SEMENOFF - 1967: Nitrogen compounds as factors of embryogenesis in vitro. *Nature* 216, 1215 - 1216.
- ROSSINI, L. - 1969: *Histophysiologie Végétale*. Une nouvelle méthode de culture in vitro de cellules parenchymateuses séparées de *Calystegia sepium* L. *C.R. Acad. Sci. Paris* 268, 683 - 685.
- SACRISTÀN, M.D. and G. MELCHERS - 1969: The caryological analysis of plants regenerated from tumorous and other callus cultures of tobacco. *Molec. Gen. Genetics* 105, 317 - 333.

- SKOOG, F. and C.O. MILLER - 1957: Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro. Symp. Soc. Exp. Biol. 11, 118 - 131.
- SCHNARF, K. - 1929: Embryologie der Angiospermen. In: Handbuch der Pflanzenanatomie, Band X/2, Bornträger, Berlin.
- SOUÈGES, R. - 1946: Les Fumariacées et la classification embryogénique. Ann. Sc. Nat. Bot. 11^e série, 1-17.
- STEWART, F.C. - 1963: Totipotency and variation in cultured cells: Some metabolic and morphogenetic manifestations. In: Plant tissue and organ culture. Sym. Intern. Soc. Plant Morphol. Delhi.
- STEWART, F.C., KENT, A.E. and M.O. MAPES - 1966: The culture of free plant cells and its significance for embryology and morphogenesis. p. 113 - 154. In: A. Monroy and A.A. Moscona, Current topics in developmental biology. New York, Academic Press.
- STREET, H.E., HENSHAW, G.G. and M.C. BUIATTI - 1965: The culture of isolated plant cells. Chem. and Ind. 2, 27 - 33.
- SUSSEX, I.M. and K.A. FREI - 1968: Embryoid development in long-term tissue cultures of carrot. Phytomorphology 18, 339 - 349.
- SYONO, K. - 1965 a: Changes in organ forming capacity of carrot root calluses during subcultures. Plant & Cell Physiol. 6, 403 - 419.
- SYONO, K. - 1965 b: Changes in response to purine and pyrimidine derivatives of carrot root callus during successive culturing. Plant & Cell Physiol. 6, 393 - 401.
- TAZAWA, M. and J. REINERT - 1969: Extracellular and intracellular chemical environments in relation to embryogenesis in vitro. Protoplasma 68, 157 - 173.
- TORREY, J.G. - 1959: Experimental modification of development in the root. In: Cell, organism and milieu. (D. Rudnick, ed.) p. 189 - 222.

- TORREY, J.G. - 1967: Morphogenesis in relation to chromosomal constitution in long-term plant tissue cultures. *Physiol. Plantarum* 20, 265 - 275.
- USUI, H. and I. TAKEBE - 1969: Division and growth of single mesophyll cells isolated encymatically from tobacco leaves. *Development, Growth and Diff.* 11, 143 - 150.
- VASIL, V. and A.C. HILDEBRANDT - 1965: Differentiation of plants from single, isolated cells in micro-culture. *Science* 150, 889 - 892.
- VASIL, I.K. and A.C. HILDEBRANDT - 1966: Variations of morphogenetic behavior in plant tissue cultures II. *Petroselinum hortense*. *Am. J. Bot.* 53, 869-874.
- VASIL, V., HILDEBRANDT, A.C. and A.J. RIKER - 1964: Growth and tissue formation from isolated single cells in microculture. *Am. J. Bot.* 51, 669 - 670.
- WENT, F.W. - 1954: Physical factors affecting growth in plants. In: *Dynamics of growth processes XI. Growth Symposium* Princeton University Press, Princeton N.J. p. 130 - 147.
- WHITE, P.R. - 1954: *The cultivation of animal and plant cells*. Ronald Press.
- YAMAGUCHI, T. and T. NAKAYIMA - 1966: On the variation of organ formation in cultured tissues derived from carrot roots. *Japan. J. Breeding* 16, 49 - 53.

Die vorliegende Dissertation wurde vom Herbst 1967 bis zum Frühjahr 1971 im Pflanzenphysiologischen Institut der Freien Universität Berlin durchgeführt.
Für Themastellung, Anregungen und Kritik zur Arbeit danke ich Herrn Professor Dr. J. Reinert.



L e b e n s l a u f

Am 8. Juni 1938 wurde ich, Dietlinde Hüseemann, als Tochter des Senatspräsidenten beim Kammergericht Adolf Backs und seiner Ehefrau Christa geb. Ronau in Berlin geboren.

Von 1944 bis 1949 besuchte ich die Grundschulen in Cunewalde/Oberlausitz sowie Berlin-Wilmersdorf und anschließend bis 1952 die Jahn-Mittelschule in Lübbecke/Westfalen. Seit 1952 war ich Schülerin der Oberschule wissenschaftlichen Zweiges in Berlin und legte 1958 die Reifeprüfung an der Paulsen-Schule-Steglitz ab.

Im Sommersemester 1958 begann ich das Studium der Biologie an der Freien Universität Berlin. Vom Wintersemester 1962/63 an war ich als studentische Hilfskraft, von 1965 an als wissenschaftliche Hilfsassistentin am Pflanzen-physiologischen Institut beschäftigt. Das Diplomexamen in Biologie bestand ich am 17.7.1967.

Am 1.10.1967 wurde ich mit der Wahrnehmung einer Assistentenstelle beauftragt und begann mit der Promotionsarbeit. Seit Mai 1968 bin ich wissenschaftliche Assistentin am Pflanzenphysiologischen Institut.

Meine akademischen Lehrer waren: Professor Dr. J. Reinert, Professor Dr. Th. Eckardt, Professor Dr. H. Drawert, Professor Dr. Ch. Thielke (Botanik); Professor Dr. W. Ulrich, Professor Dr. K. Urich, Professor Dr. K. Günther (Zoologie); Professor Dr. H. Lüers (allgemeine Biologie und Genetik); Professor Dr. K.F. Jahr, Professor Dr. G. Manecke (Chemie); Professor Dr. H. Lassen (Physik).

